

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DÉBORA GASPARIN BORATO

CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA E CICATRIZANTE
GÁSTRICA DA *Camellia sinensis* (L.) Kuntze EM RATAS

CURITIBA

2014

DÉBORA GASPARIN BORATO

CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA E CICATRIZANTE
GÁSTRICA DA *Camellia sinensis* (L.) Kuntze EM RATAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cristiane Hatsuko Baggio

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Fernanda de Paula
Werner

CURITIBA

2014

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Borato, Débora Gasparin

Caracterização da atividade gastroprotetora e cicatrizante gástrica da
Camellia sinensis (L.) Kuntze em ratas. / Débora Gasparin Borato. –
Curitiba, 2014.
107f.: il. ; 30cm.

Orientador: Cristiane Hatsuko Baggio

Co-orientadora: Maria Fernanda de Paula Werner

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Chá verde. 2. Chá preto 3. Mucosa gástrica. I. Título II. Baggio,
Cristiane Hatsuko III. Werner, Maria Fernanda de Paula. IV. Universidade
Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia.

CDD (20. ed.) 615.1



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia



PARECER

A Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado intitulada "CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA E CICATRIZANTE GÁSTRICA DA *Carmellia sinensis* (L) KUNTZE EM RATAS", de autoria da pós-graduanda DÉBORA GASPARIN BORATO, sob orientação do Prof.^a Dr.^a Cristiane Hatsuko Baggio e composta por: Prof.^a Dr.^a Cristiane Hatsuko Baggio (Presidente - Farmacologia - UFPR); Prof.^a Dr.^a Daniela de Almeida Cabrini (Farmacologia - UFPR) e Prof.^a Dr.^a Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana (Ciências Morfológicas - UEM), reuniu-se e, de acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a pós-graduanda foi Aprovada. Para a devida publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas por sua orientadora. Em Curitiba, 30 de setembro de 2014.

Cristiane Hatsuko Baggio

Prof.^a Dr.^a Cristiane Hatsuko Baggio (Presidente - Farmacologia - UFPR)

Daniela de Almeida Cabrini

Prof.^a Dr.^a Daniela de Almeida Cabrini (Farmacologia - UFPR)

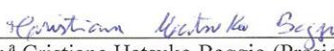
Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana

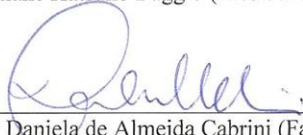
Prof.^a Dr.^a Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana (Ciências Morfológicas - UEM)



1 ATA DO JULGAMENTO DA 102ª DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

2 Ao trigésimo dia do mês de setembro do ano de dois mil e quatorze, às quatorze horas, no
3 Auditório do Departamento de Farmacologia, Anexo I, Setor de Ciências Biológicas da
4 Universidade Federal do Paraná, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação de
5 Mestrado de autoria da pós-graduanda **DÉBORA GASPARIN BORATO**, intitulada
6 "CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA E CICATRIZANTE
7 GÁSTRICA DA *Carmellia sinensis* (L) KUNTZE EM RATAS", sob orientação da Prof.^a
8 Dr.^a Cristiane Hatsuko Baggio e composta por: Prof.^a Dr.^a Cristiane Hatsuko Baggio
9 (Presidente - Farmacologia - UFPR); Prof.^a Dr.^a Daniela de Almeida Cabrini
10 (Farmacologia - UFPR) e Prof.^a Dr.^a Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana (Ciências
11 Morfológicas - UEM). A Banca Examinadora iniciou os trabalhos. A candidata teve
12 quarenta e cinco minutos para expor oralmente seu trabalho, sendo em seguida arguida
13 durante trinta minutos por cada um dos membros da Banca e tendo trinta minutos para
14 responder a cada uma das arguições. No final da sessão, a Comissão Examinadora emitiu o
15 seguinte parecer: APROVADO. Para a publicação, o trabalho deverá sofrer
16 as modificações sugeridas, que serão conferidas por sua orientadora. Nada mais havendo a
17 tratar, a Presidente deu por encerrada a sessão, da qual foi lavrada a presente ata, que será
18 assinada pela Presidente e pelos demais Membros da Comissão Examinadora em Curitiba,
19 30 de setembro de 2014.


Prof.ª Dr.ª Cristiane Hatsuko Baggio (Presidente - Farmacologia - UFPR)


Prof.ª Dr.ª Daniela de Almeida Cabrini (Farmacologia - UFPR)


Prof.ª Dr.ª Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana (Ciências Morfológicas - UEM)

***“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ninguém ainda pensou
sobre aquilo que todo mundo vê.”***

(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

A *Camellia sinensis* (L.) Kuntze é uma espécie de planta cujas folhas são utilizadas amplamente na obtenção de infusões popularmente conhecidas como “chás”. Considerando-se que diversas propriedades terapêuticas desta planta têm sido demonstradas, e que há uma grande necessidade do desenvolvimento de medicamentos anti-ulcerosos mais efetivos, este estudo teve como objetivo avaliar a atividade gastroprotetora e cicatrizante gástrica do extrato hidroalcoólico de folhas do chá verde (EHCV) e chá preto (EHCP), e dos mecanismos de ação envolvidos. O tratamento intraperitoneal dos animais com o EHCV e o EHCP protegeu a mucosa gástrica contra lesões agudas induzidas por etanol e, quando administrados por via oral, reduziu as lesões induzidas por indometacina, com a participação de fatores citoprotetores como a glutathione reduzida (GSH) e muco gástrico. No modelo de úlcera crônica induzida por ácido acético, a administração oral de EHCV e EHCP foi capaz de reduzir a área da úlcera gástrica, através da diminuição do estresse oxidativo e de parâmetros inflamatórios, além da manutenção da barreira de muco e do GSH gástricos. É importante ressaltar que o EHCV foi mais eficaz que o EHCP, indicando que o processamento, ao qual são submetidas às folhas da planta, interferem na atividade biológica. Com o objetivo de identificar os possíveis compostos responsáveis pelas atividades gastroprotetora e cicatrizante gástrica, os extratos foram submetidos ao fracionamento com solventes de diferentes polaridades, como o clorofórmio, acetato de etila e butanol. As frações butanólica e acetato de etila de ambos os extratos apresentaram gastroproteção contra lesões induzidas por indometacina, e o composto majoritário da fração acetato de etila do EHCV (FAECV), a epigallocatequina-3-O-galato (EGCG), parece ser o responsável por este efeito. As frações acetato de etila de ambos os extratos também diminuíram a área da úlcera gástrica induzida por ácido acético, por mecanismos semelhantes aos apresentados pelos EHCV e EHCP. No entanto, a EGCG quando administrada isoladamente não foi capaz de promover o mesmo efeito. Além disso, os extratos EHCV e EHCP também aumentaram o trânsito intestinal, sendo o extrato de chá preto mais potente. Adicionalmente, os animais tratados com os extratos e com suas frações acetato de etila não demonstraram sinais de toxicidade durante o tratamento repetido por sete dias. Em conclusão, estes dados mostraram que EHCV e EHCP apresentam relevante atividade antiulcerogênica e os compostos presentes nas suas frações acetato de etila, em conjunto, poderiam ser os responsáveis pela ação sobre a mucosa gástrica.

Palavras-chave: *Camellia sinensis*, chá verde, chá preto, gastroproteção, cicatrizante gástrico, motilidade.

ABSTRACT

The *Camellia sinensis* (L.) Kuntze is a species of plant whose leaves are used extensively in getting infusions popularly known as "teas". Considering that several therapeutic properties of this plant have been demonstrated, and there is a great need to develop more effective anti-ulcer medications, this study aimed to evaluate the gastroprotective and gastric healing activity of the hydroalcoholic extract green tea leaves (EHCV) and black tea (EHCP), and their mechanisms of action. The intraperitoneal treatment with the EHCV and EHCP protected the gastric mucosa against acute lesions ethanol-induced and, when administered orally, reduced lesions indomethacin-induced, with the participation of cytoprotective factors such as reduced glutathione (GSH) and gastric mucus. In the chronic ulcer model induced by acetic acid, oral administration of EHCV and EHCP was able to reduce the area of gastric ulcers by reducing oxidative stress and inflammatory parameters, besides maintaining the gastric mucus barrier and GSH. Importantly, the EHCV was more effective than EHCP indicating that the processing that the leaves of the plant are exposed interfere in its biological activity. With the aim of identifying possible compounds responsible for the gastroprotective and gastric healing activities, the extracts were subjected to fractionation with solvents of different polarities, such as chloroform, ethyl acetate and butanol. The butanol and ethyl acetate fractions from both extracts presented gastroprotection against indomethacin-induced lesions, and the major compound of the ethyl acetate fraction of EHCV (FAECV), epigallocatechin-3-O-gallate (EGCG), seems to be responsible for this effect. The ethyl acetate fractions from both extracts also decreased the area of gastric ulcer induced by acetic acid through similar mechanisms presented by EHCV and EHCP. However, the EGCG when administered alone, was unable to promote the same effect. Furthermore, EHCV and EHCP extracts also increased intestinal transit, and the black tea extract was the most potent. Further, animals treated with the extracts and its fractions ethyl acetate did not shown signs of toxicity during the repeated treatment during seven days. In conclusion, these data show that EHCV and EHCP have relevant antiulcer activity and the compounds present in its ethyl acetate fractions, together, could be responsible for the action on the gastric mucosa.

Keywords: *Camellia sinensis*, green tea, black tea, gastroprotection, gastric healing, motility.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Visão macroscópica (Painel A) e microscópica (Painel B) da úlcera gástrica, que é reparada através do processo de cicatrização (Painel C) cujos componentes principais são o tecido epitelial (margem da úlcera) e o tecido de granulação (componente mesenquimal).....	26
FIGURA 2 - Ilustração da <i>Camellia sinensis</i>	30
FIGURA 3 - Diferentes chás originados pelo processamento da <i>Camellia sinensis</i>	31
FIGURA 4 - Particionamento dos extratos de Chá Verde (EHCV) e Chá Preto (EHCP).....	36
FIGURA 5 - Efeito do tratamento intraperitoneal com EHCV (Painel A) e com EHCP (Painel B) sobre as lesões agudas induzidas por etanol P.A. em ratas.....	46
FIGURA 6 - Efeito do tratamento intraperitoneal com EHCV (Painel A) e EHCP (Painel B) sobre o conteúdo de muco da mucosa gástrica após as lesões agudas induzidas por etanol P.A. em ratas.....	47
FIGURA 7 - Efeito do tratamento intraperitoneal com EHCV (Painel A) e EHCP (Painel B) sobre o conteúdo de GSH da mucosa gástrica após as lesões agudas induzidas por etanol P.A. em ratas.....	48
FIGURA 8 - Efeito do tratamento oral com EHCV e EHCP sobre as lesões agudas induzidas por indometacina em ratas.....	49
FIGURA 9 - Imagens histológicas representativas da túnica mucosa (Painéis A, C, E, G e I) e do edema na tela submucosa (Painéis B, D, F, H e J) após lesões gástricas induzidas por indometacina em ratas.....	50

FIGURA 10 - Efeito do tratamento oral com as frações particionadas do EHCV (Painel A) e do EHCP (Painel B) sobre as lesões agudas induzidas por indometacina em ratas.....	51
FIGURA 11 - Imagens histológicas representativas da túnica mucosa (Painéis A, C, E, G, I, K e M) e do edema na tela submucosa (Painéis B, D, F, H, J, L e N) após lesões gástricas induzidas por indometacina em ratas.....	53
FIGURA 12 - Efeito do tratamento oral com EGCG sobre as lesões induzidas por indometacina (80 mg/kg) em ratas.....	54
FIGURA 13 - Imagens histológicas representativas da túnica mucosa (Painéis A, C, E e G) e do edema na tela submucosa (Painéis B, D, F e H) após lesões gástricas induzidas por indometacina em ratas.....	55
FIGURA 14 - Efeito do tratamento oral com EHCV e EHCP sobre o conteúdo de muco (Painel A) e de GSH (Painel B) da mucosa gástrica após as lesões agudas induzidas por indometacina em ratas.....	56
FIGURA 15 - Efeito do tratamento oral com as frações particionadas do EHCV (Painel A) e do EHCP (Painel B) sobre o conteúdo de muco da mucosa gástrica após as lesões agudas induzidas por indometacina em ratas.....	57
FIGURA 16 - Efeito do tratamento oral com as frações particionadas do EHCV (Painel A) e do EHCP (Painel B) sobre o conteúdo de GSH da mucosa gástrica após as lesões agudas induzidas por indometacina em ratas.....	58
FIGURA 17 - Efeito do tratamento oral com EGCG sobre o conteúdo de muco (Painel A) e de GSH (Painel B) da mucosa gástrica após as lesões agudas induzidas por indometacina em ratas.....	59
FIGURA 18 - Efeito do EHCV (Painel A) e do EHCP (Painel B) sobre a úlcera gástrica crônica induzida por ácido acético 80% em ratas.....	61

FIGURA 19 - Análise macroscópica (Painéis A, C, E e G) e microscópica (Painéis B, D, F e H) das úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético 80% em ratas.....	62
FIGURA 20 - Efeito da FAECV (Painel A) e das frações FAECP e FAqCP (Painel B) sobre a úlcera gástrica crônica induzida por ácido acético 80% em ratas.....	63
FIGURA 21 - Análise macroscópica (Painéis A, C, E e G) e microscópica (Painéis B, D, F e H) das úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético 80% em ratas.....	64
FIGURA 22 - Efeito da EGCG sobre a úlcera gástrica crônica induzida por ácido acético 80% em ratas.....	65
FIGURA 23 - Efeito do EHCV e EHCP no conteúdo de mucinas pelo método histoquímico de coloração PAS em úlcera gástrica crônica induzida por ácido acético 80% em ratas.....	67
FIGURA 24 - Efeito da FAECV e FAECP no conteúdo de mucinas pelo método histoquímico de coloração PAS em úlcera gástrica crônica induzida por ácido acético 80% em ratas.....	69
FIGURA 25 - Efeito do EHCV e do EHCP nos níveis de GSH (Painel A) e de LOOH (Painel B) após indução de úlcera crônica com ácido acético 80% em ratas.....	70
FIGURA 26 - Efeito da FAECV e da FAECP nos níveis de GSH (Painel A) e de LOOH (Painel B) após indução de úlcera crônica com ácido acético 80% em ratas.....	71
FIGURA 27 - Efeito do EHCV e do EHCP nos níveis de SOD (Painel A) e de GST (Painel B) após indução de úlcera crônica com ácido acético 80% em ratas.....	72
FIGURA 28 - Efeito da FAECV e da FAECP nos níveis de SOD (Painel A) e de GST (Painel B) após indução de úlcera crônica com ácido acético 80% em ratas.....	73
FIGURA 29 - Efeito do EHCV e do EHCP nos níveis da MPO (Painel A) e da NAG (Painel B) após indução de úlcera crônica com ácido acético 80% em ratas.....	74

FIGURA 30 - Efeito da FAECV e da FAECP nos níveis da MPO (Painel A) e da NAG (Painel B) após indução de úlcera crônica com ácido acético 80% em ratas.....	75
FIGURA 31 - Efeito do EHCV (Painel A) e EHCP (Painel B) sobre o esvaziamento gástrico em camundongos.....	75
FIGURA 32 - Efeito do EHCV (Painel A) e EHCP (Painel B) sobre o trânsito intestinal em camundongos.....	76
FIGURA 33 - Efeito da administração oral do EHCV ou EHCP (Painel A) ou da FAECV ou FAECP (Painel B) no peso corporal dos animais na úlcera gástrica induzida por ácido acético 80% em ratas após sete dias de tratamento.....	77
FIGURA 34 – Representação esquemática do efeito do EHCV, EHCP, frações e EGCG nas lesões induzidas por etanol e indometacina.....	92
FIGURA 35 – Representação esquemática do efeito do EHCV, EHCP, frações e EGCG nas lesões induzidas por ácido acético.....	92

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Efeito dos EHCV e EHCP nos parâmetros do conteúdo gástrico e na atividade péptica após ligadura do piloro.....**60**

TABELA 2 - Efeito da administração oral de EHCV e EHCP no conteúdo de mucinas pelo método histoquímico de coloração PAS em úlcera gástrica crônica induzida por ácido acético 80% em ratas.....**66**

TABELA 3 - Efeito da administração oral de FAECV e FAECP no conteúdo de mucinas pelo método histoquímico de coloração PAS em úlcera gástrica crônica induzida por ácido acético 80% em ratas.....**68**

TABELA 4 - Efeito da administração oral do EHCV, EHCP, FAECV e FAECP no peso relativo dos órgãos na úlcera gástrica induzida por ácido acético 80% em ratas após sete dias de tratamento.....**78**

TABELA 5 - Efeito da administração oral do EHCV, EHCP, FAECV e FAECP nos parâmetros bioquímicos: ALT, AST, creatinina e ureia na úlcera gástrica induzida por ácido acético 80% em ratas após sete dias de tratamento.....**79**

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA: ácido araquidônico

a.c.: antes de Cristo

AINEs : antiinflamatórios não esteroidais

ALFAC: 85 partes de álcool etílico 80%, 10 partes de formaldeído 40% e 5 partes de ácido acético glacial

ALT: alanina aminotransferase

ANOVA : Análise de variância

AST: aspartato aminotransferase

ATC : ácido tricloroacético

ATP: adenosina trifosfato

bFGF: fator de crescimento de fibroblastos básico

BHT: hidroxitolueno butilado

CAT : catalase

CDNB: 1-cloro, 2,4-dinitrobenzeno

CEUA: Comitê de Ética no uso de animais

Cl⁻ : cloreto

CO₂ : gás carbônico

COX: enzima ciclooxigenase

COX-1: enzima ciclooxigenase subtipo 1

COX-2: enzima ciclooxigenase subtipo 2

DE₅₀: dose efetiva 50%

DMSO :dimetil-sulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucléico

D.O.: densidade ótica

DTNB: ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)

EDTA : ácido etilenodiaminotetracético

EGCG: epigallocatequina galato

EGF: fator de crescimento epidermal

EHCV: extrato hidroalcoólico de chá verde

EHCP: extrato hidroalcoólico de chá preto

EP: receptores prostanóides ou de prostaglandinas

EP1 : receptor de prostaglandina subtipo 1
EP2 : receptor de prostaglandina subtipo 2
EP3 : receptor de prostaglandina subtipo 3
EP4 : receptor de prostaglandina subtipo 4
Eq: equivalente-grama
EROs: espécies reativas de oxigênio
 Fe^{+2} : íon ferroso
 Fe^{+3} : íon férrico
Fe III: óxido de ferro III
FAECP: fração acetato de etila do chá preto
FAqCP: fração aquosa do chá preto
FCICP: fração clorofórmica do chá preto
FBuCP: fração butanólica do chá preto
FAECV: fração acetato de etila do chá verde
FAqCV: fração aquosa do chá verde
FBuCV: fração butanólica do chá verde
FCICV: fração clorofórmica do chá verde
 FeSO_4 : sulfato ferroso ou sulfato de ferro (II)
GO: glutatona oxidase
GPx : glutatona peroxidase
GR : glutatona redutase
GSH : glutatona reduzida
GSSG: glutatona oxidada
GST : glutatona-S-transferase
 H^+ : próton ou íon hidrogênio
 $\text{H}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$: hidrogênio, potássio adenosina trifosfatase
 H_2 : receptor de histamina subtipo 2
 H_2O_2 : peróxido de hidrogênio
 H_2CO_3 : ácido carbônico
 H_2SO_4 : ácido sulfúrico
HClO: hipocloroso
HCl : ácido clorídrico
 HCO_3^- : íon bicarbonato
 H_2CO_3 : ácido carbônico

HE: hematoxilina e eosina

HO²: hidroperoxila

HSP-70: proteína do choque térmico 70

HTAB: hexadeciltrimetilamônio

IBP: inibidores da bomba de prótons

ICAM-1: molécula de adesão intercelular 1

i.d.: via intraduodenal

IGF-1: fator de crescimento insulina-símile 1

IL-1 α : proteína da família da interleucina-1 subtipo alfa

IL-1 β : proteína da família da interleucina-1 subtipo beta

IMS: empresa de marketing farmacêutico

i.p.: via intraperitoneal

kD: kilo Dalton

LOOH: lipoperoxidação

LTB4: tipo de leucotrieno B4

LTC4: tipo de leucotrieno C4

M: Molar

MPO : mieloperoxidase

NaCl : cloreto de sódio

NaDPH : nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NAG: N-acetilglucosamidase

NaOH : hidróxido de sódio

NO: óxido nítrico

O₂·: ânion superóxido

O₃: ozônio

OECD: Organização para cooperação e desenvolvimento econômico

OH·: hidroxila

OMS: Organização Mundial da Saúde

P.A.: pureza analítica

PAS: ácido periódico de Schiff

PDGF: fator de crescimento derivado das plaquetas

pH : potencial hidrogeniônico

PGs: prostaglandinas

PGE₂: prostaglandina E₂

PGI₂: prostaciclina I₂

PNPIC: Política Nacional de Práticas Integrativas

PNPMF: Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada

RO²: peroxila

SOD : superóxido desmutase

SUS: Sistema Único de Saúde

TGF- α : fator de crescimento transformador alfa

TMB: tetrametilbenzidina

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

TRIS: tris(hidroximetil)aminometano

TXA₂: tipo de tromboxano A₂

UFPR : Universidade Federal do Paraná

UV: ultravioleta

VEGF : fator de crescimento endotelial vascular

v.o : via oral

v/v: volume/volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Úlcera péptica.....	19
1.2 Aspectos farmacológicos do tratamento da úlcera.....	27
1.3 Uso de plantas medicinais.....	28
1.3.1 <i>Camellia sinensis</i>	30
2. OBJETIVOS.....	34
2.1 Objetivo geral.....	34
2.2 Objetivos específicos.....	34
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 Material biológico e preparação dos extratos, frações e composto isolado.....	35
3.2 Animais.....	36
3.3 Lesões gástricas induzidas por etanol	37
3.4 Lesões gástricas induzidas por indometacina.....	37
3.5 Determinação do conteúdo de muco gástrico.....	37
3.6 Avaliação da secreção ácida gástrica.....	38
3.6.1 Quantificação do volume e acidez total da secreção gástrica.....	38
3.6.2 Quantificação da atividade péptica.....	39
3.7 Úlcera gástrica induzida por ácido acético.....	39
3.8 Análise histológica.....	40
3.9 Avaliação do conteúdo de mucina.....	40
3.10 Preparação das frações subcelulares do estômago.....	41
3.11 Dosagem de proteínas.....	41
3.12 Quantificação dos níveis da glutathione reduzida (GSH).....	41
3.13 Quantificação dos níveis de lipoperóxidos (LOOH).....	42
3.14 Determinação da atividade enzimática da glutathione S-transferase (GST).....	42
3.15 Determinação da atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD).....	42
3.16 Determinação dos níveis da mieloperoxidase (MPO).....	43
3.17 Determinação dos níveis da N-acetilglucosamidase (NAG).....	43
3.18 Avaliação da motilidade gastrointestinal.....	44
3.19 Avaliação toxicológica.....	45
3.20 Análise estatística.....	45

4. RESULTADOS.....	46
4.1 Efeito do EHCv e do EHCP sobre as lesões gástricas induzidas por etanol.....	46
4.2 Efeito do EHCv e do EHCP sobre o conteúdo de muco e GSH gástricos após a lesão induzida por etanol.....	46
4.3 Efeito do EHCv e do EHCP sobre as lesões gástricas induzidas por indometacina.....	48
4.4 Efeito das frações particionadas do EHCv e do EHCP sobre as lesões gástricas induzidas por indometacina.....	51
4.5 Efeito da EGCG sobre lesões gástricas induzidas por indometacina.....	54
4.6 Efeito do EHCv e do EHCP sobre o conteúdo de muco e GSH gástricos após a lesão induzida por indometacina.....	56
4.7 Efeito das frações particionadas do EHCv e do EHCP sobre o conteúdo de muco e GSH gástricos após a lesão induzida por indometacina.....	57
4.8 Efeito da EGCG sobre o conteúdo de muco e GSH gástricos após lesão induzida por indometacina.....	58
4.9 Efeito do EHCv e do EHCP sobre a secreção gástrica basal e atividade péptica.....	59
4.10 Efeito do EHCv e do EHCP sobre a úlcera gástrica crônica induzida por ácido acético.....	61
4.11 Efeito das frações FAECv, FAqCP e FAECP sobre a úlcera gástrica crônica induzida por ácido acético.....	63
4.12 Efeito da EGCG sobre a úlcera gástrica crônica induzida por ácido acético.....	65
4.13 Efeito do EHCv e do EHCP sobre o conteúdo de mucina após a indução de úlcera gástrica crônica por ácido acético.....	66
4.14 Efeito das frações FAECv e FAECP sobre o conteúdo de mucina após a indução de úlcera gástrica crônica por ácido acético.....	68
4.15 Efeito do EHCv e do EHCP sobre os níveis de GSH e LOOH após a indução de úlcera gástrica crônica por ácido acético.....	70
4.16 Efeito das frações FAECv e FAECP sobre os níveis de GSH e LOOH após a indução de úlcera gástrica crônica por ácido acético.....	70
4.17 Efeito do EHCv e do EHCP sobre os níveis de SOD e GST após a indução de úlcera gástrica crônica por ácido acético.....	71
4.18 Efeito das frações FAECv e FAECP sobre os níveis de SOD e GST após a indução de úlcera gástrica crônica por ácido acético.....	72
4.19 Efeito do EHCv e do EHCP sobre os níveis da MPO e NAG após a indução de úlcera gástrica crônica por ácido acético.....	73

4.20 Efeito das frações FAECV e FAECP sobre os níveis de MPO e NAG após a indução de úlcera gástrica crônica por ácido acético.....	74
4.21 Efeito do EHCV e do EHCP sobre a motilidade gastrointestinal.....	75
4.22 Efeito do tratamento por sete dias com EHCV, EHCP, FAECV e FAECP sobre parâmetros toxicológicos.....	76
5. DISCUSSÃO.....	80
6. CONCLUSÃO.....	91
REFERÊNCIAS.....	93

1. INTRODUÇÃO

1.1 ÚLCERA PÉPTICA

A úlcera péptica, termo referido tanto para úlcera duodenal quanto para a úlcera gástrica, é uma lesão profunda na parede intestinal ou gástrica, que penetra através de toda a espessura da túnica mucosa, destruindo componentes do tecido epitelial, conjuntivo e muscular subjacente, incluindo miofibroblastos subepiteliais, células do músculo liso, vasos e nervos (MILANI e CALABRO, 2001; TARNAWSKI, 2005). A diferenciação de quando uma lesão gástrica se torna uma úlcera é o aprofundamento da mesma até penetrar através da camada muscular da mucosa (TARNAWSKI *et al.*, 2013).

A úlcera geralmente é uma doença de evolução crônica e recorrente (BRUNTON *et al.*, 2006; BOGLIOLO e BRASILEIRO FILHO, 2011), que quando ocorre no estômago, acomete principalmente o antro pilórico (65%) e a junção do antro com o corpo estomacal na curvatura gástrica menor (25%). A úlcera gástrica pode acometer indivíduos de ambos os sexos ou qualquer idade, mas ocorre com maior frequência em mulheres e acima dos 60 anos de idade (RAMAKRISHNAN *et al.*, 2007, THORSEN *et al.*, 2011).

A identificação de agentes causadores da úlcera, como o *Helicobacter pylori*, bem como o desenvolvimento de fármacos eficazes [inibidores da bomba de prótons (IBP) e os antagonistas dos receptores histaminérgicos H_2] nos últimos anos promoveram o declínio deste transtorno (MALMI *et al.*, 2014). Porém, uma meta-análise realizada por Lin *et al.* (2011) mostra que ainda são altas as taxas de incidência de úlcera péptica na população, sendo aproximadamente 1 caso por 1000 pessoas-ano. Essas taxas podem ser explicadas em parte, pelo envelhecimento da população e com isso o surgimento de comorbidades associadas, que levam ao aumento da prescrição de fármacos ulcerosos como os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) (LOURENÇO e OLIVEIRA, 2003). No Brasil, a incidência de úlcera gástrica na população varia de 1 a 20%, sendo que não há, até o momento, estatísticas muito precisas, enquanto que nos Estados Unidos estima-se que cerca de 20 milhões de pessoas apresentarão uma úlcera durante a vida (FBG, 2014).

A úlcera interfere muito na qualidade de vida dos pacientes, seja em decorrência de seus sintomas, como a dor epigástrica, náusea, enjôo e sensação de saciedade precoce, ou em decorrência de suas complicações, que podem acometer até 30% dos pacientes, e incluem hemorragia digestiva alta (20%), perfuração (6%) e obstrução piloro-duodenal (4%). Estas

complicações são importantes causas de morbimortalidade, resultando em custos substanciais diretos e indiretos (OFMAM *et al.*, 2000; LAU *et al.*, 2011).

A patogênese da doença ulcerosa péptica envolve muitas causas, dentre as quais se destacam as relacionadas a fatores genéticos, fatores endógenos (distúrbios fisiopatológicos com aumento da produção de suco gástrico, motilidade anormal) e fatores exógenos (físicos, biológicos e químicos) como o estresse, dieta alimentar, uso de AINEs e infecção por *H. pylori* (CARVALHO, 2000). Vale ressaltar ainda, que os dois últimos agentes mencionados são as causas mais frequentes de úlcera (OKABE *et al.*, 2012) e atuam de forma similar sobre a mucosa ao desarmarem os mecanismos de defesa, deixando o epitélio suscetível a ação do fluido gástrico, que é bastante ácido (pH ~ 1-2) (YEOMANS, 2011).

A ocorrência da infecção gástrica por *H. pylori* é alta no mundo inteiro e atinge até 90% da população (THE HELICOBACTER FOUNDATION, 2014), mas apesar disso, interessantemente, grande parte dos hospedeiros desta bactéria podem nunca apresentar sintomas gástricos durante a vida, e somente 30% deles desenvolvem um quadro de úlcera gástrica (KONTUREK *et al.*, 2006). Citotoxinas (endotoxina e citotoxina vacuolizante de 87kD) e componentes do metabolismo da própria bactéria, como as ureases, permitem que o *H. pylori* sobreviva no fluido gástrico. Além disso, seu formato espiralado, a existência de flagelos e fatores de adesão possibilitam à bactéria atravessar facilmente a camada de muco (ALGOOD e COVER, 2006). Uma vez instalada na superfície do epitélio gástrico, a virulência da cepa bacteriana somada a fatores ambientais e do hospedeiro é que levam a diferenças subsequentes no desenvolvimento da doença (KONTUREK *et al.*, 2006).

Os AINEs constituem um dos grupos farmacológicos mais consumidos em todo mundo (IMS, 2014), sendo que entre as pessoas de 65 anos de idade ou mais, cerca de 70% relatam o uso desta classe de medicamentos pelo menos uma vez por semana (TALLEY *et al.*, 1995). Apesar de sua eficiente ação analgésica, anti-plaquetária e contra mediadores inflamatórios, um fator limitante para o uso dos AINEs é a sua toxicidade gastrointestinal. Entre 5 e 30% dos pacientes que ingerem altas doses de AINEs a longo prazo desenvolvem um quadro de úlcera gástrica (HAUSER, 2011). Destes, entre 1 e 2% chegam a complicações graves decorrentes da úlcera, com gastos em recursos da saúde e mortalidade bastante significativos, especialmente entre os idosos (MUSUMBA *et al.*, 2012). O principal mecanismo de ação dos AINEs é a inibição específica da enzima ciclooxigenase (COX) e consequente redução da conversão do ácido araquidônico (AA) em prostaglandinas (PGs), que por sua vez participam da indução da resposta inflamatória. Entretanto, no trato gastrointestinal, esta supressão da síntese de PGs, afeta o controle da secreção gástrica, da

secreção epitelial de muco e bicarbonato, além de conduzir à diminuição da microcirculação local. Logo, apesar da ação irritante local desempenhada por alguns AINEs, estes eventos sistêmicos são cruciais para a patogênese da úlcera induzidas por esta classe de fármacos (FORNAI *et al.*, 2005).

Sendo assim, a mucosa gástrica está exposta à agressão constante por vários agentes nocivos, mas, em contrapartida, é capaz de manter sua integridade estrutural e funcional devido a inúmeros mecanismos de defesa (TARNAWSKI *et al.*, 2013). Tais mecanismos ocorrem em três níveis: (1) pré-epitelial, (2) epitelial e (3) sub-epitelial (DE FONESKA e KAUNITZ, 2010), e apesar de se subdividirem, atuam em conjunto para resistir a até 0,1 mol/L de HCl e a ação da pepsina, presentes no lúmen gástrico (TARNAWSKI e AHLUWALIA, 2012), ou a outros agentes exógenos.

A primeira barreira (linha de defesa pré-epitelial) consiste na camada de muco e bicarbonato. O muco é produzido em todo trato gastrointestinal, desde o estômago até o cólon, por células epiteliais, estimulado por hormônios gastrointestinais como a gastrina, secretina, ou pelas PGs e agentes colinérgicos (LAINE *et al.*, 2008). É constituído principalmente por água (95%), lipídeos e glicoproteínas denominadas mucinas. Estruturalmente, a unidade de mucina trata-se de um tetrâmero ligado por pontes dissulfeto, com 80% de seu peso composto por carboidratos. A polimerização das unidades de mucina é que dá origem ao gel viscoso, que se adere à mucosa, e tem por finalidade prevenir o ataque bacteriano a esta superfície (WALLACE, 2001), reter íons bicarbonato secretados, além de impedir a ação proteolítica da pepsina no epitélio gástrico (LAINE *et al.*, 2008). No entanto, vários agentes como, por exemplo, o álcool e a pepsina, podem clivar as ligações próximas aos centros dos tetrâmeros, dissolvendo a camada de muco protetora. Quando isso ocorre, novas mucinas são sintetizadas, a fim de restabelecer a integridade da camada mucosa (BERNE *et al.*, 2004).

O bicarbonato, por sua vez, também é produzido pelas células epiteliais superficiais da mucosa gastroduodenal quando estimuladas pelo cálcio, PGs, estímulos colinérgicos e acidificação do lúmen gástrico, e proporciona um gradiente de pH que pode chegar a 6-7 ao longo da superfície das células epiteliais, enquanto que na superfície luminal do estômago o pH fica em torno de 1-2 (LAINE *et al.*, 2008). O bicarbonato é responsável pela “maré alcalina”, que ocorre no sangue venoso gástrico logo após a secreção gástrica. Isso ocorre porque quando as células parietais liberam íons H^+ , simultaneamente transportam o íon bicarbonato pela membrana basolateral através da troca de Cl^-/HCO_3^- . Assim, para cada íon

de H^+ secretado pela célula parietal, uma molécula de CO_2 é convertida em bicarbonato, o que resulta no aumento de sua disponibilidade (DE FONESKA e KAUNITZ, 2010).

Se a barreira pré-epitelial for destruída, outros mecanismos de proteção são recrutados, como o componente epitelial, cuja proteção da mucosa gástrica é conferida pelos aspectos anatômicos e bioquímicos das células epiteliais gástricas. O tecido epitelial é formado por uma camada contínua de células superficiais ligadas por junções oclusivas, que controlam a passagem de substâncias do lúmen para a lâmina própria e submucosa gástrica. Outra característica é que a superfície epitelial é formada por fosfolipídeos, que por sua vez conferem hidrofobicidade ao tecido epitelial funcionando como uma barreira contra a ação da secreção ácida (TARNAWSKI *et al.*, 2013). O epitélio gástrico é, ainda, responsável pela produção de bicarbonato, muco, fosfolipídios, peptídeos, PGs e proteínas de choque térmico (LAINE *et al.*, 2008), além de estar em constante renovação celular, mecanismos essenciais para a manutenção da integridade da mucosa gástrica.

Quase todos os mecanismos de defesa gástrico são modulados pelas PGs (TARNAWSKI *et al.*, 2013), que também desempenham uma vasta gama de efeitos biológicos em outros tecidos. As prostaglandinas E_2 (PGE_2) e as prostaciclina (PGI_2), essenciais para proteção do trato gastrointestinal, são sintetizadas pela enzima ciclooxigenase (COX) da isoforma tipo 1 (COX-1) (expressa constitutivamente) (ATAY *et al.*, 2000; CALDER *et al.*, 2001) e estão envolvidas na inibição da secreção ácida, na liberação de bicarbonato e muco, na inibição sobre as funções de neutrófilos, incluindo quimiotaxia e adesão de leucócitos ao endotélio vascular, na manutenção de um fluxo sanguíneo adequado da mucosa e na restituição das células epiteliais (LAINE *et al.*, 2008). Adicionalmente, as PGs contribuem para a citoproteção também pela estabilização das membranas lisossomais, mitocondrial e celular, e pela prevenção da apoptose e/ou preservação do citoesqueleto celular e transporte de íons (TAKEUCHI *et al.*, 1987), sendo que a diversidade de funções desempenhadas, especialmente pela PGE_2 , é decorrente de sua ligação com quatro diferentes tipos de receptores prostanóides, denominados EP1, EP2, EP3 e EP4 (ATAY *et al.*, 2000).

A formação de novos vasos sanguíneos é outro importante mecanismo para o sistema de defesa sub-epitelial, visto que atua tanto na manutenção quanto na reparação de danos causados ao epitélio gástrico (TARNAWSKI, 2005). A extensa rede vascular além de fornecer nutrientes e oxigênio para a mucosa, aumenta o aporte de bicarbonato, que neutraliza a acidez gástrica gerada através da secreção de ácido clorídrico pelas células parietais, elimina toxinas e é responsável pela produção de potentes vasodilatadores, como o óxido nítrico (NO) e as PGI_2 . Estes agentes, através do relaxamento do músculo liso, protegem a mucosa de

danos causados por substâncias vasoativas e pró-inflamatórias, como as endotelinas, leucotrienos C_4 e tromboxano A_2 , que por sua vez diminuem a microcirculação da mucosa (WALLACE, 2008). O NO ainda, junto com as PGs, são importantes na continuidade do fluxo sanguíneo durante a reepitelização (HOLZER e SAMETZ, 1986; LAINE *et al.*, 2008).

O controle angiogênico e da proliferação celular é realizado através de fatores de crescimento. No caso da proliferação endotelial, a hipóxia ativa a produção local de fatores de crescimento, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF), e a expressão dos seus receptores, essencial para a angiogênese (TARNAWSKI, 2005; SATO *et al.*, 2014). Já o fator de crescimento transformador α (TGF- α), o fator de crescimento insulina-símile 1 (IGF-1) e o fator de crescimento epidermal (EGF), também produzidos localmente, além do fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), estão envolvidos no estímulo da proliferação e migração das células epiteliais, através da ação em receptores específicos, que iniciam uma cascata de eventos intracelulares, acelerando o processo de cura gástrica (NGUYEN *et al.*, 2007). Estudos também demonstram o papel das survivinas, proteínas anti-apoptóticas expressas nas células epiteliais e nas células progenitoras do epitélio gástrico, no controle do processo de renovação celular deste epitélio, em caso de injúria no tecido (CHIOU *et al.*, 2005; JONES *et al.*, 2010).

Um aporte inadequado de nutrientes à mucosa, resultante de falhas nos níveis superficiais de defesa, pode gerar isquemia e morte tecidual, que por sua vez, associada ao aumento de substâncias quimiotáticas, ativa a liberação de agentes pró-inflamatórios (TNF- α , IL-1 α e IL-1 β) pelos leucócitos que são atraídos até o local da lesão (TARNAWSKI, 2005). Assim, inicia-se uma resposta inflamatória aguda, que inclui o aumento do fluxo sanguíneo, extravasamento plasmático e migração de leucócitos polimorfonucleados até o foco da lesão, onde são ativados para fagocitar produtos da destruição tecidual e para eliminar o agente nocivo através de um arsenal de enzimas hidrolíticas e proteínas bactericidas, estocadas em seus grânulos citoplasmáticos (ROBBINS *et al.*, 2013).

Os grânulos azurófilos dos neutrófilos apresentam níveis elevados da enzima mieloperoxidase (MPO), que juntamente com outras enzimas, estão envolvidas na geração de radicais livres, espécies químicas que contém um ou mais elétrons desemparelhados e incluem as espécies reativas de oxigênio (EROs) (MATHY-HARTERT *et al.*, 1998). As EROs compreendem os radicais de oxigênio, como radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroxila (OH^{\bullet}), peroxila (RO^2) e hidroperoxila (HO^2) e outros agentes oxidantes que não são radicais, mas que podem ser facilmente convertidos a tais, dentre os quais se destacam o peróxido de

hidrogênio (H_2O_2), o ácido hipocloroso (HClO) e o ozônio (O_3) (HALLIWELL e GUTRIDGE, 1989). Estas moléculas, por serem altamente instáveis, tende a associar-se com outras estruturas, podendo desempenhar papel de defesa, ao interagirem com organismos patogênicos, mas também danos celulares, quando ocorre o estresse oxidativo, processo em que as EROs são produzidas mais rapidamente do que são removidas pelos mecanismos de defesa das células (HELLOU *et al.*, 2012).

As células gastrointestinais possuem importantes agentes que removem os EROs cataliticamente, dentre os quais figuram a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx). A SOD é uma metaloproteína que converte a maior parte do oxigênio consumido em peróxido de hidrogênio por dismutação do radical ânion superóxido. Yasui e Baba (2006) demonstraram que a SOD apresenta um importante poder inibitório da inflamação, visto que, o ânion superóxido aumenta a infiltração de neutrófilos pela geração de quimiotáticos (leucotrienos B4) ou pelo aumento da expressão de moléculas de adesão (ICAM-1). No entanto, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), gerado pela ação da SOD, não é considerado um radical livre, mas, por ser um metabólito extremamente deletério, está envolvido na geração de outros agentes oxidantes muito mais danosos, como o radical $\bullet\text{OH}$ e o ácido hipocloroso (HOCl) (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). Sendo assim, na tentativa de evitar seus efeitos citotóxicos, o H_2O_2 é removido através de outros sistemas enzimáticos antioxidantes, que incluem a CAT e a GPx (NORDBERG e ARNER, 2001). A CAT atua na remoção do H_2O_2 através da dismutação do mesmo em água e oxigênio molecular. Adicionalmente, os níveis de hidroperóxidos fosfolipídicos podem ser controlados por uma segunda enzima, a glutathione peroxidase (GPx), através da redução do H_2O_2 em água (CNUBBEN *et al.*, 2001).

Além destas enzimas, outros compostos não-enzimáticos, como a glutathione reduzida (GSH) possuem papel central na defesa contra o estresse oxidativo (FESHAREKI *et al.*, 2006). Estruturalmente, o GSH trata-se de um tiol tripeptídeo, presente em altas concentrações nas células, sendo o principal sistema endógeno antioxidante existente. Esta capacidade provém do grupo sulfidril presente em sua estrutura, que é responsável por reações com compostos químicos eletrofílicos, tornando-os mais estáveis. Porém, para que esta atividade protetora se mantenha, o GSH, que sofre oxidação através das enzimas glutathione oxidase (GO) e glutathione peroxidase (GPx) formando a glutathione oxidada (GSSG), precisa ser regenerado (CNUBBEN *et al.*, 2001). Em condições normais ocorre um ciclo redox, em que o GSSG é reduzido para GSH pela glutathione redutase (GR) na presença de NADPH. Porém, em condições de estresse oxidativo, o GSSG é exportado da célula por

proteínas transportadoras dependentes de ATP, para manter o ambiente de oxi-redução (CNUBBEN *et al.*, 2001). Em geral, o GSH é um importante protetor do sistema gastrointestinal assim como dos demais sistemas fisiológicos, e vários estudos demonstram seu envolvimento e de suas enzimas nos diversos processos biológicos, seja como antioxidante, cofator enzimático na redução de peróxidos pela GPx ou ainda, envolvido no metabolismo de xenobióticos pela família da glutathione S-transferase (GST), enzimas multifuncionais que catalisam a conjugação de compostos eletrofílicos a GSH, produzindo assim compostos menos reativos (WOUTERS *et al.*, 2011).

Quando ocorre a exacerbação de um fator agressor (HCl, pepsina), seja por uma causa endógena como a citada, ou ainda quando um agente agressor exógeno está presente (uso de AINEs ou infecção por *H. pilory*), ocasionado a diminuição dos mecanismos defensores, a úlcera se forma (TARNAWSKI *et al.*, 2013).

Em 90% dos casos, a úlcera gástrica é única, redonda ou ovalada, com bordas bem regulares, tendendo a afunilar-se à medida que se aprofundam no tecido, com diâmetro de 0,5 a 2 cm (BOGLIOLO e BRASILEIRO FILHO, 2011), como exemplificada na Fig. 1A. Histologicamente a úlcera caracteriza-se por duas grandes estruturas: a margem (formada por tecido adjacente não necrosado da mucosa, denominado componente epitelial) e o tecido de granulação na base da úlcera (denominado componente tecidual conectivo), formado por fibroblastos, macrófagos e células endoteliais (TARNAWSKI, 2005) (Fig. 1B).

A cicatrização da úlcera tem início no terceiro dia após a lesão (TARNAWSKI e AHLUWALIA, 2012) e inclui a proliferação e migração celular, angiogênese e remodelação do tecido (TARNAWSKI, 2005). Todos estes processos são controlados basicamente por fatores de crescimento, além das citocinas, hormônios e fatores de transcrição, capazes de estimular a proliferação e migração celular (TARNAWSKI *et al.*, 2013). Logo, as células necróticas vão sendo substituídas pela migração de células sobreviventes da margem da úlcera para o tecido de granulação, para que assim ocorra a reepitelização, processo que tem como principal finalidade, a proteção do tecido contra infecções, danos mecânicos e químicos (LAINE *et al.*, 2008). Já a restauração da lâmina própria é realizada pelo tecido de granulação, através da angiogênese e restabelecimento de toda a arquitetura glandular (TARNAWSKI *et al.*, 2013) (Fig. 1C).

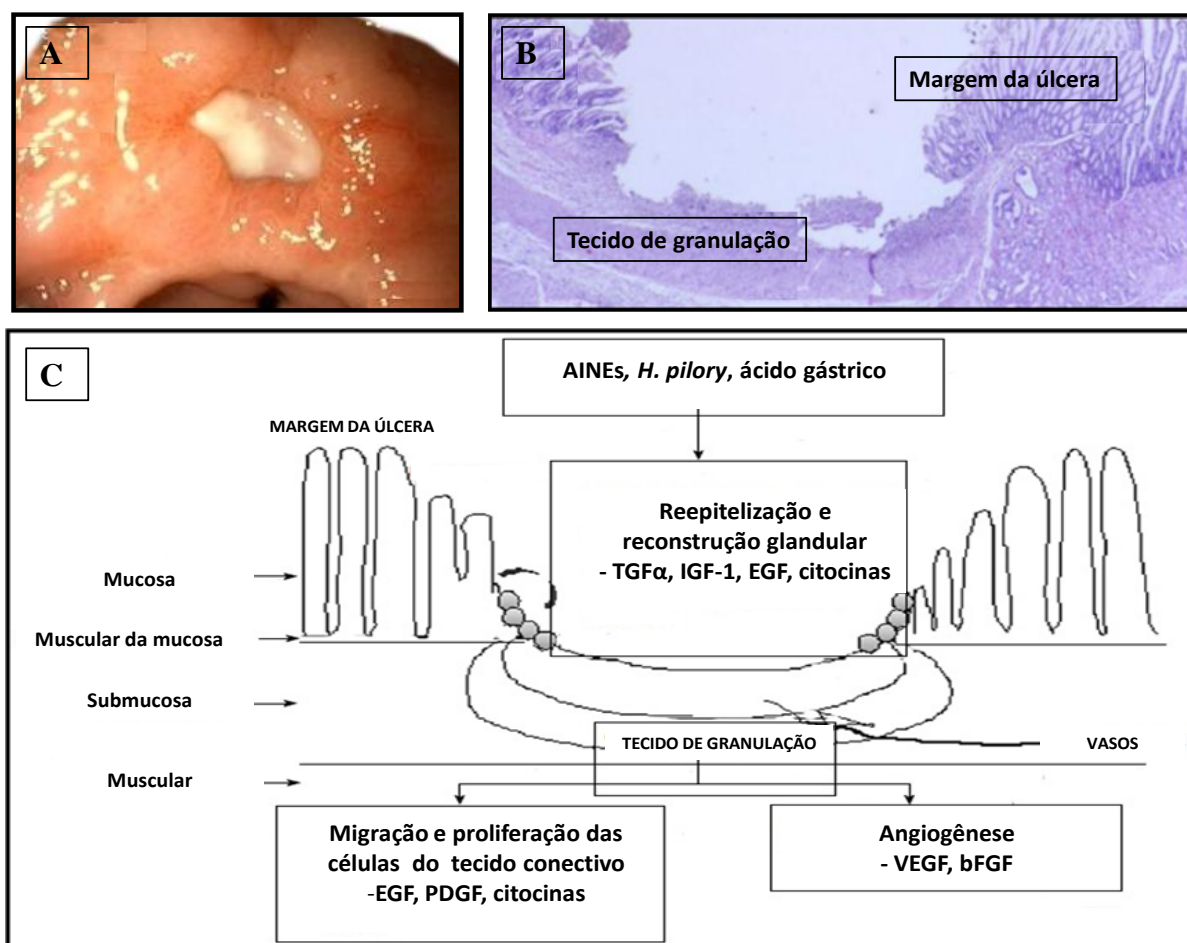


FIGURA 1 - VISÃO MACROSCÓPICA (PAINEL A) E MICROSCÓPICA (PAINEL B) DA ÚLCERA GÁSTRICA, QUE É REPARADA ATRAVÉS DO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO (PAINEL C) CUJOS COMPONENTES PRINCIPAIS SÃO O TECIDO EPITELIAL (MARGEM DA ÚLCERA) E O TECIDO DE GRANULAÇÃO (COMPONENTE MESENQUIMAL).

FONTE: Adaptado de TARNAWSKI e AHLUWALIA (2012), <http://pdg.molig.com/stomaco-gastrico-ulcera> e <http://patologiaunifenasbh.blogspot.com>).

Vale ressaltar que anormalidades histológicas e estruturais, como o desenvolvimento de glândulas gástricas dilatadas e/ou com alterações degenerativas, desorganização do sistema microvascular e infiltração permanente de neutrófilos no local da lesão, com produção constante de EROs, podem ocorrer durante a cicatrização. Estas alterações podem interferir na diminuição da oxigenação, do fornecimento de nutrientes e da resistência da defesa da mucosa. Portanto, estas falhas, associadas a fatores ulcerogênicos, estão diretamente relacionadas à recorrência da úlcera (TARNAWSKI *et al.*, 2013; ARAKAWA *et al.*, 2012). Assim, a qualidade de recuperação estrutural da mucosa é um fator importante a ser observado, ao considerarmos que uma recorrência anual da úlcera é esperada (BRUNTON *et al.*, 2006). Estudos já evidenciam a procura de fármacos que atuem em conjunto com os tratamentos convencionais para melhorar a qualidade de cicatrização e evitar a recorrência da úlcera (KANGWAN *et al.*, 2014).

1.2 ASPECTOS FARMACOLÓGICOS DO TRATAMENTO DA ÚLCERA

Quando os mecanismos de defesa fisiológicos são superados, ou, não são suficientes para evitar a ação dos fatores agressores, a úlcera é formada e o tratamento farmacológico se faz necessário.

Em meados de 1904, época de grandes avanços na compreensão da fisiologia da digestão, prevalecia na comunidade médica a ideia da associação do excesso de ácido ao desenvolvimento da úlcera péptica, já que mais de 90% dos pacientes com úlcera apresentavam sinais de hipercloridria (GUSTAFSON, 2010). Então, era prescrito aos pacientes com úlcera, fracionamento das dietas, ingestão de pequenas quantidades de alimentos durante o dia, uso de atropina e diferentes preparados à base de bicarbonato de sódio, magnésio, alumínio ou bismuto, para neutralização do pH (DIAZ-RUBIO, 2005). Entretanto, apenas uma melhora parcial dos sintomas era observada, com grandes índices de recorrência, o que ocasionou uma ascensão do tratamento cirúrgico para o controle da úlcera. No entanto, a elevada taxa de complicações pós-operatórias, fez diminuir a aceitação dos procedimentos cirúrgicos pelos médicos e pacientes (GINZBURG e MAGE, 1938), alavancando, desta forma, o surgimento de novas alternativas terapêuticas.

Na década de 70 houve o advento da terapia farmacológica, com o surgimento dos antagonistas competitivos de receptores H_2 , presentes nas células parietais (cimetidina, ranitidina, nizatidina e famotidina). Estes, assim como os IBPs (omeprazol, lansoprazol, pantoprazol, rabeprazol e esomeprazol), desenvolvidos logo depois, têm como função reduzir a secreção de ácido gástrico (WALLACE e SHARKEY, 2012), e são, atualmente, os medicamentos de escolha para o tratamento da úlcera devido à intensa supressão ácida (FBG, 2014).

Outra classe de medicamentos empregada no tratamento da úlcera inclui os citoprotetores, que melhoram os mecanismos endógenos de proteção da mucosa e/ou proporcionam uma barreira física à superfície da úlcera (misoprostol, sucralfato e sais de bismuto). Há ainda, os casos de úlcera causada pelo *H. pylori*, em que se associa à terapia com anti-secretores, os antibióticos (claritromicina, amoxicilina, metronidazol, tinidazol, tetraciclina e fluorquinolonas, como levofloxaxino e moxifloxacino) (WALLACE e SHARKEY, 2012; RIMBARA *et al.*, 2011).

Embora com todo avanço na terapia farmacológica gástrica, a úlcera péptica, em muitos casos, tende para recidiva (ARAKAWA *et al.*, 2012; KANGWAN *et al.* 2014), o que pode indicar certa limitação na eficácia dos medicamentos anti-úlcera atualmente disponíveis.

Além disso, é crescente a preocupação com os efeitos adversos decorrentes do uso em longo prazo dos tratamentos clássicos (IBP e antagonistas H_2) (GARCIA-RODRIGUEZ e RUIGOMEZ, 2007), que incluem o desenvolvimento de pólipos gástricos (RAGHUNATH *et al.*, 2005), infecções entéricas e osteoporose (CHUBINEH e BIRK, 2012), além de apresentarem várias interações com outros medicamentos e alimentos.

Neste contexto, em que se faz necessário o desenvolvimento de medicamentos mais efetivos e seguros, os chás de *Camellia sinensis* tem atraído atenção especial devido às suas características de promoção da saúde e por serem facilmente incorporados na alimentação como um alimento funcional.

1.3 USO DE PLANTAS MEDICINAIS

O uso de fitoterápicos, medicamentos obtidos empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais (BRASIL, 2004), acompanha a evolução da humanidade e continua a expandir-se rapidamente em todo o mundo. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) demonstram que 65 a 80% da população ainda confiam nos produtos à base de plantas para tratar suas doenças, sendo que no Brasil, 92% da população já fizeram uso de alguma planta medicinal (ABIFISA, 2014; RAHMAN e SINGHAL, 2002).

Além do seu potencial terapêutico amplamente considerado na medicina popular, as plantas constituem a maior fonte de matéria-prima para a descoberta de novas moléculas, sendo que muitas são utilizadas na clínica até os tempos atuais, como a morfina (*Papaver somniferum*), digoxina (*Digilanata Talis*), teobromina (*Theobroma cacao*), vinblastina (*Catharanthus roseus*), entre outras (CALIXTO *et al.*, 2001a). Segundo Lahlou (2013), 45% dos medicamentos mais vendidos da atualidade são provenientes de produtos naturais ou de seus derivados.

No Brasil, considerando a grandeza de sua biodiversidade e o número de espécies vegetais que ainda não foram avaliadas quanto as suas propriedades biológicas, a possibilidade de descoberta de novos princípios ativos e do desenvolvimento de novos medicamentos a partir de plantas são promissores. O país conta com mais de 55 mil espécies descritas, o que corresponde a 22% do total mundial (BRASIL, 2014; SIMÕES *et al.*, 2004). Poucas áreas da pesquisa cresceram tanto no Brasil quanto a pesquisa com plantas, sendo um reflexo disso, a liderança do Brasil entre os países da América Latina no número de publicações internacionais na área de plantas (42%) (CALIXTO, 2005).

Ainda são muitas as dificuldades e falta de uniformidade para o controle de qualidade e para comprovação de segurança e eficácia dos medicamentos fitoterápicos, assim como para o desenvolvimento de políticas públicas relacionadas às medicinas tradicionais e ao uso de plantas medicinais. No Brasil, a principal legislação atual que regulamenta critérios relacionados ao uso, qualidade e eficácia de matéria-prima vegetal, derivados de droga vegetal e medicamento fitoterápico é a RDC nº 14/10. A comercialização de plantas na forma rasurada para a preparação de chás, especificamente, pode ser enquadrada como alimento, cuja regulamentação ocorre através das resoluções RDC nº 267/05, RDC nº 277/05, RDC nº 278/05 e RDC nº 219/06.

Na última década, a aceitação da fitoterapia pela população, assim como por profissionais de saúde da atenção básica, fez aumentar a atuação das autoridades e das administrações de saúde em relação ao uso de plantas medicinais. No Brasil, em 2006, duas importantes políticas foram publicadas: a Política Nacional de Práticas Integrativas (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS) pela Portaria nº 971, de 3 de maio de 2006 e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) através do Decreto Presidencial nº 5.813, de 22 de junho de 2006, que ampliaram as opções terapêuticas oferecidas aos usuários do SUS, com garantia de acesso a plantas medicinais, fitoterápicos e outros serviços relacionados, com segurança, eficácia e qualidade. A *Maytenus ilicifolia* (Espinheira-santa), compondo um fitoterápico indicado no tratamento de úlceras e gastrites, foi pioneira, dentre as plantas com atuação sobre o trato gastrointestinal, na Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos.

É notório o crescimento dos estudos de plantas medicinais que possuam ação sobre o trato gastrointestinal nos últimos anos. Curiosamente, a primeira droga sistematicamente efetiva contra úlceras gástricas, a carbenoxolona, foi descoberta como resultado de pesquisas com *Glycyrrhiza glabra* (Alcaçuz), comumente usada pelos indígenas (AKTAR e MUNIR, 1989). Mais recentemente, pesquisas realizadas demonstraram que algumas espécies vegetais têm um potencial antiulcerogênico que pode ser comparado a fármacos como a ranitidina e omeprazol, das quais citamos a *Curcuma longa*, com atividade inibidora do crescimento de *Helicobacter pylori* e de aumento do muco (ARAUJO e LEON, 2001; MAHADY *et al.*, 2002; PRUCKSUNAND *et al.*, 2001), a *Arctium lappa*, com a redução da secreção gástrica e do estresse oxidativo (SANTOS *et al.*, 2008), e duas espécies do gênero *Maytenus*, a *M. ilicifolia* e *M. aquifolium*, com atividade inibidora da secreção gástrica e aumento da barreira de muco (SOUZA-FORMIGONI, 1991; JORGE *et al.*, 2004; BAGGIO *et al.*, 2012). Tais

descobertas são fundamentais ao considerarmos a importante incidência de problemas digestivos na população.

Segundo dados do IMS Health, em 2011 o mercado de fitoterápicos movimentou cerca de R\$ 1,1 bilhão no Brasil, aumento de 13% em relação ao ano anterior, e em todo mundo milhares de produtos de origem vegetal são utilizados nas mais variadas formas. A decocção das folhas (chá) de *Camellia sinensis* (L.) Kuntze é a bebida não alcoólica mais consumida no mundo depois da água (SHARANGI, 2009), sendo que esta grande procura pelo chá se deve, além de suas propriedades medicinais que já foram evidenciadas em vários estudos científicos, ao seu aroma e sabor agradáveis.

1.3.1 *Camellia sinensis*

A *C. sinensis* (L.) Kuntze (Fig. 2), família Theaceae, é uma planta perene, do tipo arbustiva e originária do sudeste da China, que foi gradualmente sendo introduzida na Índia, Sri Lanka e em muitos países tropicais e subtropicais (SIMÕES *et al.*, 2004). Atualmente, é cultivada e consumida em mais de 160 países, especialmente os da Ásia (KUMUDAVALLY *et al.*, 2008). No Brasil, o cultivo de *C. sinensis* é restrito ao Vale do Ribeira no Estado de São Paulo, e a maior parte é destinada para a produção do chá preto, com ascensão também para a produção de chá verde (NISHIYAMA *et al.*, 2010).



FIGURA 2 - ILUSTRAÇÃO DA *Camellia sinensis*.

FONTE: <http://www.camelliasrus.com.au/species.htm> e http://en.wikipedia.org/wiki/Camellia_sinensis.

Historicamente uma lenda chinesa diz que no ano 2737 a.c., o imperador Shen Nung descansava sob um arbusto comum na região quando algumas folhas caíram em uma vasilha de água que seus servos ferviam para beber. Atraído pelo aroma, o imperador provou o líquido e aprovou. O arbusto a que a história se referia era a *C. sinensis* e assim nascia o chá. No Brasil, acredita-se que o chá tenha chegado por intermédio de Luiz de Abreu, um pequeno comerciante e agricultor de Portugal, que obteve as sementes de *C. sinensis* e as ofereceu a D. João VI, quando esse chegou ao Brasil. Logo depois houve uma grande difusão do cultivo da planta, pela criação do Jardim Botânico no Rio de Janeiro em 1808, onde foram feitas as primeiras plantações. Em 1814, após a chegada de alguns chineses, houve um aumento na produção e também um aprimoramento no consumo dos chás (BASU e LUCAS, 2007).

A partir da *C. sinensis* é possível se obter diversos tipos de chás, sendo que a diferenciação entre eles ocorre pelo processamento à que as folhas da planta são submetidas no fabrico de cada tipo de chá (Fig. 3). A produção dos diferentes chás consiste basicamente em interromper, em um estado pré-determinado, através da remoção da água das folhas via aquecimento, o processo de oxidação das folhas da planta, que se inicia logo após a coleta, catalisado pelas enzimas polifenol oxidase e peroxidase, ao interagirem com o oxigênio. Através deste procedimento ou pela sua interrupção, é possível produzir os chás: verde e branco (não oxidados), oolong ou vermelho (semi-oxidado) e preto (oxidado) (ENGELHARDT, 2010). Além disso, uma técnica de fermentação microbiana anaeróbica tem sido empregada, originando o chá pu-erh (fermentado) (OKADA *et al.*, 1996).

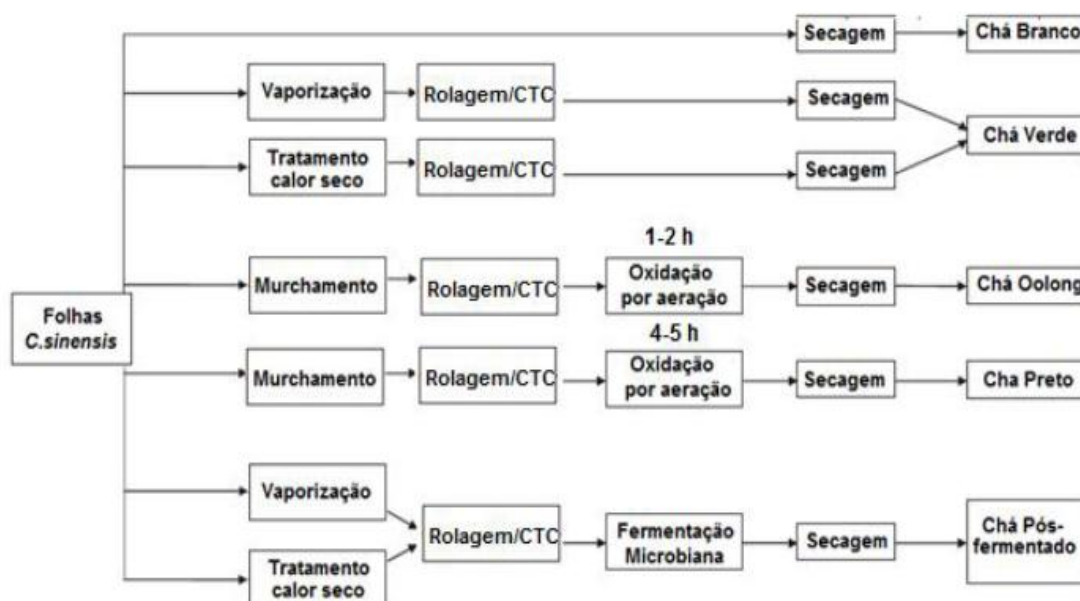


FIGURA 3 - DIFERENTES CHÁS ORIGINADOS PELO PROCESSAMENTO DA *Camellia sinensis*.
FONTE: SCOPARO (2010).

Os chás da *C. sinensis* são muito utilizados na medicina tradicional para o tratamento de várias desordens tais como obesidade, hipercolesterolemia e dispepsia. Recentemente, vários estudos têm comprovado estas propriedades terapêuticas, além de evidenciarem outras como a anticarcinogênica (YANG *et al.*, 2011), antiobesidade, antidiabética e hipocolesterolêmica (SAE-TAN *et al.*, 2011), antioxidante (COOPER *et al.*, 2005; MANIAN *et al.*, 2007), antiinflamatória (DE MEJIA *et al.*, 2009), redução do risco de doenças cardiovasculares (MINEHARU *et al.*, 2011), melhora da função cognitiva (KURIYAMA *et al.*, 2006), proteção da pele contra os raios ultra-violeta (PANDYA *et al.*, 2004) e aumento da densidade mineral óssea (DEVINE *et al.*, 2007). Estas atividades biológicas podem ser atribuídas a composição química bastante diversificada desta planta.

Os principais constituintes incluem proteínas, carboidratos, lipídeos, ácido ascórbico, terpenos (óleos essenciais, saponinas, β -caroteno), alcalóides (cafeína, teobromina, teofilina), compostos fenólicos (catequinas, ácido caféico), além de frações voláteis, carotenóides, tocoferóis, vitaminas (A, K, B, C), aminoácidos (ácido gama-etilamina-L-glutâmico) e minerais, como, flúor, potássio, magnésio, ferro, manganês, fósforo, entre outros (ENGELHARDT, 2010).

As partes da planta utilizadas na produção dos chás são as folhas e brotos, que concentram em média 30% de compostos fenólicos, dependendo das condições de cultivo (SIMÕES *et al.*, 2004). De todos os constiuintes, os polifenóis parecem ter um papel de destaque nos benefícios à saúde e são responsáveis, por exemplo, pela prevenção de doenças cardiovasculares, câncer (CHEN *et al.*, 2008) e pelo efeito gastroprotetor (HAMAISHI *et al.*, 2006). Sabe-se que o conteúdo de polifenóis nos chás de *C. sinensis* pode variar, e que, no chá verde é de 30 a 40%, enquanto que no preto apenas de 3 a 10% (SHARANGI, 2009). Além disso, dentre os compostos fenólicos, no chá verde os que se destacam são os flavanóis ou catequinas e no chá preto as teaflavinas, formadas pela condensação de catequinas. No chá verde, as catequinas podem chegar a 75% do conteúdo de flavonóides, enquanto no chá preto elas representam somente 20 a 30%. Estas diferenças podem influenciar o sabor da bebida, e servir também como um indicativo da qualidade do produto (SCOPARO, 2010).

Além das atividades atribuídas aos metabólitos secundários, como os compostos fenólicos, os compostos provenientes do metabolismo primário, como os carboidratos, também apresentam efeitos hipoglicemiante e antibacteriano (LEE *et al.*, 2007; TAKEO, 1992). Outro estudo realizado por Sparg *et al.* (2004) evidenciou propriedades farmacológicas da *C. sinensis* atribuídas aos terpenos (antioxidante, citotóxica e antimutagênica) e às

saponinas (hemolítica, moluscicida, antiinflamatória, antifúngica, antibacteriana, antiparasitária, antiviral, antitumoral e hipocolesterolêmica).

Em especial, no que tange ao efeito antiulcerogênico, estudos já demonstraram esta atividade de chás obtidos da *C. sinensis* (MAITY *et al.*, 1995; MAITY *et al.*, 2001; BANERJEE *et al.* 2010) assim como de alguns grupos de compostos ou compostos isolados presentes nesta planta, como as saponinas (MORIKAWA *et al.*, 2006; YOSHIKAWA *et al.*, 2005), catequinas (HAMAISHI *et al.*, 2006), teaflavinas (ADHIKARY *et al.*, 2011b), epicatequina (ROZZA *et al.*, 2012) e a epigallocatequina galato (ADHIKARY *et al.*, 2011a). Recentemente, nosso grupo de pesquisa, em parceria com o Departamento de Bioquímica da UFPR, constatou o efeito gastroprotetor contra o etanol do extrato hidroalcoólico, de frações e de um composto proveniente de chás da *C. sinensis* (SCOPARO *et al.*, 2014). Deste modo, considerando as atividades benéficas da *Camellia sinensis* já comprovadas através de estudos científicos, o baixo custo e a facilidade de acesso e integração dos chás à dieta rotineira, o presente estudo tem como objetivo investigar o efeito dos chás verde e preto obtidos desta planta em outros modelos experimentais de úlceras gástricas agudas e no modelo crônico em ratas, e os possíveis mecanismos de ação envolvidos nestas atividades.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Caracterizar a atividade gastroprotetora e cicatrizante gástrica dos extratos hidroalcoólicos do chá verde (EHCV) e do chá preto (EHCP), bem como de suas frações e de um composto isolado presente na *Camellia sinensis* em ratas e os possíveis mecanismos de ação envolvidos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a atividade gastroprotetora do EHCV e do EHCP em modelos de lesões gástricas agudas em ratas;
- Avaliar se na atividade gastroprotetora do EHCV e do EHCP existe a participação do muco e GSH;
- Analisar o efeito do EHCV e do EHCP sobre a secreção ácida gástrica de ratas;
- Verificar o efeito cicatrizante do EHCV e do EHCP no modelo de úlcera crônica induzida por ácido acético em ratas;
- Avaliar se no efeito cicatrizante do EHCV e do EHCP há a participação da mucina gástrica;
- Investigar se na ação cicatrizante do EHCV e do EHCP existe o envolvimento do sistema antioxidante;
- Verificar se no efeito cicatrizante do EHCV e do EHCP existe a participação do processo inflamatório;
- Avaliar a atividade do EHCV e do EHCP sobre a motilidade gastrointestinal de camundongos;
- Analisar a ação tóxica do EHCV e do EHCP em ratas;
- Identificar as frações e os compostos responsáveis pelas atividades biológicas do EHCV e do EHCP através do fracionamento biomonitorado.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO E PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS, FRAÇÕES E COMPOSTO ISOLADO

As folhas secas de chá verde e preto foram obtidas de marcas comerciais em um mercado local (Curitiba, Estado do Paraná, Brasil) e os extratos fornecidos pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Marcello Iacomini do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná.

Em resumo, as amostras (100 g de cada) foram submetidas à extração hidroalcoólica, em 500 ml de solução de etanol 70% (v/v), sob refluxo por 1 h (3 x). Os extratos então foram filtrados, concentrados em evaporador rotativo obtendo-se assim os extratos hidroalcoólicos do chá verde (EHCV) e do chá preto (EHCP), os quais foram liofilizados e armazenados em freezer -20 °C até o momento do uso.

Os extratos hidroalcoólicos de ambos os chás (500 mg) foram solubilizados em 100 ml de água e então foram submetidos a particionamento líquido-líquido, com os seguintes solventes (100 ml cada) em ordem crescente de polaridade: clorofórmio, acetato de etila e butanol. Desta forma obtiveram-se as frações clorofórmica, acetato de etila, butanólica e aquosa do chá verde (FCICV, FAECV, FBuCV e FAqCV, respectivamente) e do chá preto (FCICP, FAECP, FBuCP e FAqCP, respectivamente). A Fig. 4 traz a representação esquemática do particionamento realizado, bem como os rendimentos respectivos a cada etapa de fracionamento. Estas frações foram secas em evaporador rotativo e então armazenadas em freezer -20 °C para análises posteriores.

O composto isolado utilizado, epigallocatequina-3-O-galato (EGCG), foi obtido da Sigma-Aldrich e diluído em água.

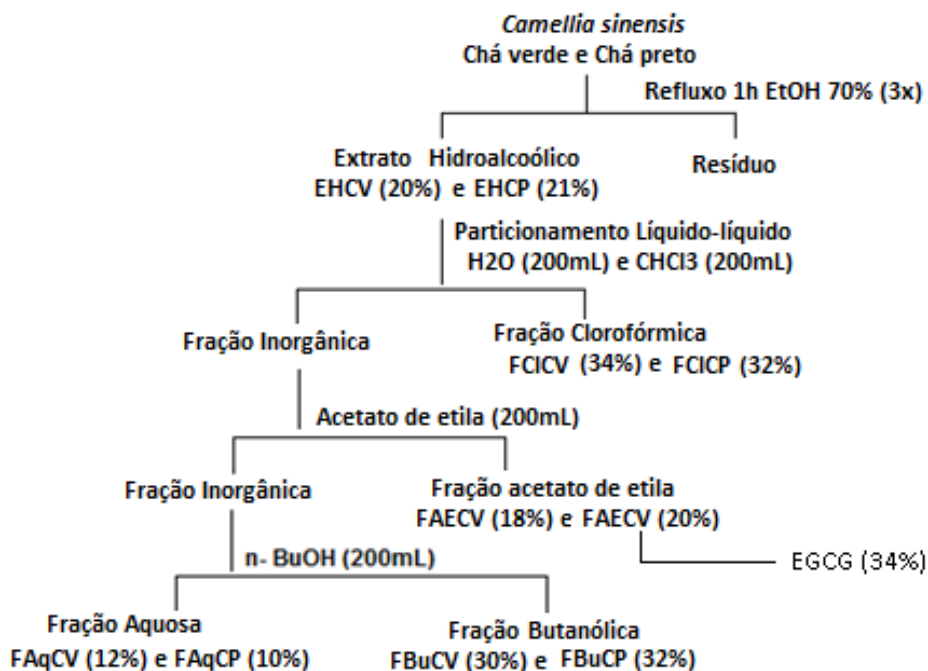


FIGURA 4 - PARTICIONAMENTO DOS EXTRATOS DE CHÁ VERDE (EHCV) E CHÁ PRETO (EHCP).
 FONTE: Adaptado de SCOPARO *et al.* (2014).

3.2 ANIMAIS

Para os experimentos foram utilizados ratos (*Ratus norvegicus*, variedade Wistar), adultos, fêmeas, com peso variando entre 180 e 250 g e camundongos (*Mus musculus*, variedade Swiss), adultos, fêmeas, com peso variando entre 25 e 30 g, fornecidos pelo Biotério da Universidade Federal do Paraná. Estes animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura e iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas), com livre acesso à água e ração. Os ratos permaneceram em jejum sólido por 12-18 h e os camundongos por 6-8 h antes dos experimentos.

Todos os protocolos experimentais estavam de acordo com normas internacionais e foram aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Paraná sob o número 689.

3.3 LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS POR ETANOL

Lesões hemorrágicas na mucosa gástrica foram produzidas por instilação intra-gástrica de etanol absoluto em ratas (ROBERT *et al.*, 1979). Os animais foram pré-tratados com o veículo (salina, 0,1 mL/100 g, i.p.), omeprazol (40 mg/kg, v.o.) ou extratos [EHCV (0,003; 0,03 e 0,3 mg/kg) e EHCP (0,01; 0,1 e 1 mg/kg), i.p.] e, após 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) do pré-tratamento, foi administrado para cada animal etanol absoluto (P.A.) (0,5 mL/200 g) por via oral. Uma hora após a administração do etanol, os animais foram submetidos à eutanásia e os estômagos removidos, abertos pela curvatura menor e estendidos para a análise das lesões gástricas. A avaliação das lesões foi realizada através do programa ImageTool® Versão 3.0, no qual a área total lesionada de cada estômago foi expressa em mm².

3.4 LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS POR INDOMETACINA

As lesões na mucosa gástrica induzidas por indometacina foram realizadas segundo metodologia de Morimoto *et al.* (1991) com algumas modificações. As ratas foram oralmente pré-tratadas com veículo (água, 0,1 mL/100g), omeprazol (40 mg/kg), prostaglandina E₂ (PGE₂, 20 µg/kg), extratos [EHCV (3,6 mg/kg) e EHCP (10,2 mg/kg)], frações dos extratos [FCICV (1,2 mg/kg), FAECV (0,6 mg/kg), FBuCV (1 mg/kg), FAqCV (1 mg/kg), FCICP (3,2 mg/kg), FAECP (2 mg/kg), FBuCP (3,2 mg/kg) e FAqCP (1 mg/kg)] ou epigallocatequina-3-O-galato (EGCG, 204 µg/kg). Sessenta minutos após o pré-tratamento, as lesões gástricas foram induzidas pela administração oral de indometacina (80 mg/kg, 1 mL/100 g). Seis horas após a administração da indometacina, os animais foram submetidos à eutanásia e os estômagos removidos, abertos pela curvatura gástrica menor até a região do fundo gástrico e estendidos para a análise das lesões gástricas. A avaliação das lesões foi realizada através do programa ImageTool® Versão 3.0, no qual a área total lesionada de cada estômago foi expressa em mm².

3.5 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE MUCO GÁSTRICO

O muco gástrico foi quantificado usando a porção glandular (corpo) obtida dos estômagos ulcerados por etanol ou indometacina. O tecido gástrico foi pesado e transferido

para uma solução de Alcian Blue (0,1%), preparada em uma solução de sacarose (0,16 mM) e acetato de sódio (50 mM, pH 5). O tecido foi mantido nesta solução em temperatura ambiente durante duas horas. Após este procedimento, os segmentos foram lavados duas vezes com solução de sacarose (250 mM) durante 15 e 45 minutos, respectivamente. Depois, o conteúdo de corante no tecido complexado com o muco gástrico foi extraído com solução de cloreto de magnésio (500 mM) agitando cada segmento por 1 min a cada 30 min durante 2 h. O material extraído foi então misturado com igual volume de éter dietílico e centrifugado a 1300 x g durante 10 minutos. A fase aquosa foi separada para leitura em comprimento de onda de 598 nm. O conteúdo de muco foi calculado usando uma curva padrão de Alcian Blue (6,25-100 µg) e os resultados foram expressos em µg de Alcian Blue/g de tecido (CORNE *et al.*, 1974).

3.6 AVALIAÇÃO DA SECREÇÃO ÁCIDA GÁSTRICA

A secreção ácida gástrica foi avaliada após a realização da ligadura do piloro em ratas (SHAY *et al.*, 1945). Os animais foram tratados com veículo (água, 0,1 mL/100g, i.d. ou v.o. ou salina, 0,1 mL/100g, i.p.), omeprazol (40 mg/kg, v.o.), EHCV (1, 3 e 10 mg/kg, i.d. ou 10 mg/kg, v.o. ou 1 mg/kg, i.p.) ou EHCP (3, 10 e 30 mg/kg, i.d. ou 30 mg/kg, v.o. ou 3 mg/kg, i.p.), imediatamente depois (quando tratados por via intraduodenal), 30 min antes (quando tratados por via intraperitoneal) ou 1 h antes (quando tratados pela via oral) da ligadura do piloro. Para a ligadura, as ratas foram anestesiadas com xilazina e cetamina (10 e 5 mg/kg, i.p., respectivamente) e através de uma incisão na parede abdominal, o estômago foi localizado e realizada a ligadura pilórica com auxílio de um fio de sutura. Posteriormente, o estômago foi recolocado na cavidade, a parede abdominal suturada e após 4 h de ligadura, os animais foram submetidos à eutanásia. Então, o estômago foi removido cuidadosamente após pinçamento do esôfago e a secreção gástrica foi recolhida.

3.6.1 Quantificação do volume e acidez total da secreção gástrica

A mucosa gástrica foi lavada com 3 mL de água destilada e o conteúdo gástrico centrifugado a 1077 x g por 20 min. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para uma proveta para medida do volume (mL), e a acidez total (mEq[H⁺]/mL) foi determinada por titulação simples com NaOH 0,1 N, utilizando fenolftaleína 2% como indicador ácido-base (DOMER, 1971).

3.6.2 Quantificação da atividade péptica

Para quantificação da atividade da pepsina, foram coletados 100 μ L da secreção ácida gástrica produzida após 4 h de ligadura pilórica, conforme descrito anteriormente. As amostras foram então transferidas para tubos de polipropileno e incubadas com 500 μ L de solução de albumina bovina (5 mg/mL em HCl 0,06 N) a 37 °C por 10 min. A reação foi interrompida adicionando-se 500 μ L de ácido tricloroacético (ATC) 10% e centrifugada a 1500 x g durante 20 min. A seguir, 1 mL do sobrenadante foi separado e alcalinizado com 5 mL de carbonato de sódio 0,55 M. Posteriormente, 500 μ L de reagente de Folin 1 N foi adicionado aos tubos e incubado por 30 min em temperatura ambiente. Após o período de incubação, alíquotas de 300 μ L de cada tubo foram transferidas para microplaca e a absorbância das soluções foi determinada por leitura espectrofotométrica a 660 nm. Os valores individuais foram interpolados em uma curva padrão de tirosina (30-1000 μ mol/mL) e os resultados expressos em μ mol de tirosina/mL/4 h (ANSON, 1938).

3.7 ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO

As lesões gástricas induzidas por ácido acético seguiram a metodologia originalmente proposta por Okabe *et al.* (1971), com algumas modificações. As ratas foram anestesiadas com xilazina e cetamina (10 mg/kg e 5 mg/kg i.p., respectivamente), tendo a parede abdominal aberta e o estômago exposto. Para a indução das úlceras, 500 μ L de ácido acético 80% ficaram em contato com a túnica serosa na região do corpo gástrico com o auxílio de um cilindro de 6 mm de diâmetro. Após 1 min, o ácido acético foi retirado, o local lavado com salina, o estômago recolocado na cavidade e a parede abdominal suturada. Após a recuperação da anestesia, os animais retornaram ao biotério e passaram por um período de 24 h de recuperação, em que permaneceram sob regime de restrição alimentar, e com consumo de água livre até o dia seguinte. Então, os animais foram mantidos sob dieta alimentar, na qual a ração foi ofertada duas vezes ao dia, num tempo de uma hora cada, durante todo o período do tratamento. O tratamento dos animais foi iniciado no segundo dia após a cirurgia e teve a duração de sete dias, sendo realizado duas vezes ao dia, 30 min após a oferta de ração. Os animais receberam pela via oral veículo (água, 0,1 mL/100 g), omeprazol (20 mg/kg), extratos [EHCV (1, 3, 10 e 30 mg/kg) e EHCP (3, 10, 30 e 100 mg/kg)], frações [FAECV (1,8 mg/kg), FAECP (6 mg/kg), e FAqCP (3 mg/kg)] e o composto EGCG (612 μ g/kg). No final do

tratamento, os animais foram eutanasiados, seus estômagos foram removidos e as úlceras medidas em comprimento x altura (mm²) com auxílio de uma régua graduada.

3.8 ANÁLISE HISTOLÓGICA

As amostras provenientes de estômagos com lesões induzidas por indometacina (região do corpo gástrico, medindo aproximadamente 10 mm de largura e 3 mm de comprimento) e da úlcera induzida por ácido acético foram fixadas em solução de ALFAC (álcool 80 °GL 85%, formaldeído 10% e ácido acético glacial 5%) por 24 h. As peças foram então desidratadas e incluídas em parafina, e após este procedimento, os blocos foram cortados em micrótomo em 7 µm de espessura. Uma parte das lâminas com os cortes foi submetida à coloração de hematoxilina e eosina (HE), para análise de mudanças histopatológicas e da extensão das úlceras (KALLAYA *et al.*, 2006) e outra parte foi submetida à coloração de ácido periódico de Schiff (PAS) para quantificação do conteúdo de mucinas. As lâminas foram observadas e fotografadas em scanner de lâminas (Meta Viewer Version 2.0, MetaSystems, North Royalton, OH, USA. Aumento de 20 e 100X).

3.9 AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO DE MUCINA

A análise histoquímica de acordo com Mowry e Winkler (1956) foi utilizada para verificar alterações na quantidade de mucinas (componente do muco gástrico) após a úlcera induzida por ácido acético. As lâminas contendo os cortes histológicos foram desparafinizadas, reidratadas, oxidadas em ácido periódico 0,5% por 5 min e lavadas em água destilada. Após este procedimento, as amostras foram coradas com reativo de Schiff durante 20 min e subsequentemente lavadas com água sulfurosa (três vezes durante 2 min) e em água corrente durante 10 min. Por último, as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina durante 20 s e desidratadas. A intensidade da cor púrpura, que se refere às glicoproteínas (mucinas) coradas pelo ácido periódico de Schiff (PAS), foi quantificada com o programa Image J® e os resultados expressos em (pixels/campo x 10⁴) (PEREIRA *et al.*, 2012).

3.10 PREPARAÇÃO DAS FRAÇÕES SUBCELULARES DO ESTÔMAGO

As amostras do estômago foram homogeneizadas em tampão fosfato 200 mM (pH 6,5) a 4 °C e o homogenato foi usado para avaliação de indicadores não enzimáticos do estresse oxidativo, como a glutathiona reduzida (GSH) e os níveis de lipoperóxidos (LOOH). Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 9000 x g durante 20 min. O sobrenadante foi coletado para determinação da proteína e atividade das enzimas glutathiona *S*-transferase (GST) e superóxido dismutase (SOD). O pellet foi utilizado para determinação das enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-acetilglucosamidase (NAG).

3.11 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

As concentrações de proteína foram determinadas pelo método de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), utilizando albumina de soro bovino como padrão e realizada de acordo com as instruções do fabricante.

3.12 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DA GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)

O método para a determinação dos níveis de GSH presentes na mucosa gástrica foi realizado segundo Sedlak e Lindsay (1968). Amostras da mucosa gástrica previamente submetida ao etanol, indometacina, e da úlcera por ácido acético foram utilizadas para quantificar os níveis de GSH. Em 50 µL deste homogenato foram adicionados 40 µL de ATC 12,5%, agitados durante 10 min e centrifugados durante 15 min a 900 x g. Subsequentemente, alíquotas de 10 µL do sobrenadante foram colocadas em microplaca, as quais foi adicionado 290 µL do tampão TRIS (0,4 M, pH 8,9) e 5 µL de 5,5'-ditiobis 2-ácido nitrobenzóico (DTNB, 1 mM) para início da reação, 5 min antes da leitura espectrofotométrica (415 nm). Os valores individuais da absorbância foram interpolados em uma curva padrão de GSH (0,375-3 µg) e expressos em µg de GSH/g de tecido.

3.13 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE LIOPERÓXIDOS (LOOH)

A quantidade de LOOH foi determinada pelo método de FOX descrito por Jiang *et al.* (1991), que é baseado na oxidação de Fe^{2+} (sulfato de amônio ferroso) em Fe^{3+} por hidroperóxido em meio ácido, na presença de um complexo de pigmentos de Fe (III) de alaranjado de xilenol. Para tanto, o homogenato da úlcera por ácido acético foi diluído em metanol 90% (100 μL do homogenato + 10 μL de metanol 90%), pH 6,5, sonicado e centrifugado a 9000 x g durante 20 min a 4 °C. Em seguida, alíquotas do sobrenadante (30 μL) foram incubadas por 30 min em temperatura ambiente com 270 μL do meio reacional contendo 1 mL de alaranjado de xilenol, FeSO_4 250 μM , H_2SO_4 25 mM e de BHT (Hidroxitolueno butilado) 4 mM em metanol 90%. As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 560 nm e os resultados expressos em mmol/mg de tecido.

3.14 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST)

A determinação da atividade da GST foi realizada com base no método de Habig *et al.* (1974). A atividade específica da GST foi determinada pela conjugação do dicloro nitrobenzeno (CDNB) com GSH, formando um tioéter que pode ser monitorado pelo aumento de absorbância. Assim, aos 50 μL do sobrenadante obtido da centrifugação do homogenato de úlcera induzida por ácido acético foram adicionados 50 μL de solução-reação contendo CDNB 3 mM (diluído em etanol P.A.) e GSH 3 mM (diluída em tampão fosfato). A conjugação do CDNB com o GSH foi monitorada em espectrofotômetro a 340 nm por 90 s. A atividade da GST foi calculada usando um coeficiente de extinção de 9,6/mM/cm para GSH e os resultados expressos em $\mu\text{moles/min/mg}$ de proteína.

3.15 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

A determinação da atividade da SOD baseia-se na capacidade desta enzima em inibir a auto-oxidação do pirogalol. As reações foram realizadas em tampão TRIS HCl-EDTA (HCl 200 mM com EDTA 2 mM em pH 8,5). Uma alíquota do sobrenadante obtido da

centrifugação do homogenato de úlcera induzida por ácido acético (20 µL) foi misturada com tampão TRIS HCL-EDTA e agitados em vórtex por 1 min. Após este procedimento, foram adicionados 25 µL de pirogalol 1 mM e a solução foi incubada por 20 min em temperatura ambiente. Para interromper a reação, 12,5 µL de HCl 1 N foram adicionados e em seguida foi realizada uma centrifugação por 4 min a 18700 x g. O sobrenadante foi então separado para leitura em espectrofotômetro a 405 nm. A quantidade de SOD que inibe a oxidação do pirogalol em 50%, relativamente ao controle, foi definida como uma unidade de atividade da SOD. A atividade enzimática foi expressa em U/mg de proteína (MARKLUND e MARKLUND, 1974; GAO *et al.*, 1998).

3.16 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DA MIELOPEROXIDASE (MPO)

A quantificação da enzima MPO foi determinada seguindo o método de Bradley *et al.* (1982) com modificações de De Young *et al.* (1989). O pellet obtido da centrifugação do homogenato de úlcera induzida por ácido acético foi ressuspensionado em 1 mL de tampão fosfato de potássio 80 mM (pH 5,4) na presença de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) 0,5%. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 11000 x g por 20 min a 4 °C. Em placas de 96 poços foram adicionados 30 µL do sobrenadante, acrescidos de 220 µL de uma solução contendo: 100 µL de tampão fosfato de potássio 80 mM, 85 µL de tampão fosfato de potássio 22 mM e 15 µL de H₂O₂ 0,017%. A reação foi iniciada com a adição de 20 µL de tetrametilbenzidina (TMB) e incubada por 3 min a 37 °C. A reação foi interrompida com 30 µL de acetato de sódio 1,46 M (pH 3,0) e os níveis enzimáticos foram determinados em espectrofotômetro a 620 nm. Os resultados foram expressos como unidade de densidade óptica (D.O.)/mg de proteína.

3.17 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DA N-ACETILGLUCOSAMIDASE (NAG)

A atividade da NAG é baseada na hidrólise do p-nitrofenil-N-acetil-β-D glucosamina (substrato) pela N-acetil-β-D glucosamidase, liberando p-nitrofenol (BAILEY, 1988). Para a análise foram incubados 25 µL do sobrenadante, obtido da centrifugação do pellet do homogenato de úlcera induzida por ácido acético ressuspensionado em 1 mL de tampão fosfato de potássio 80 mM (pH 5,4) na presença de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) 0,5%, com 100

μL de tampão citrato (5 mM, pH 4,5) na presença de 25 μL do substrato (2,24 mM) durante 60 minutos a 37 °C. A reação foi interrompida com 100 μL tampão glicina (200 mM, pH 10,4) e os níveis enzimáticos foram mensurados em espectrofotômetro a 405 nm. Os resultados foram expressos como unidade de densidade óptica (D.O.)/mg de proteína.

3.18 AVALIAÇÃO DA MOTILIDADE GASTROINTESTINAL

Esse método consiste na administração de um marcador semisólido colorido (vermelho de fenol 0,05% em carboximetilcelulose 1,5%) para avaliação do esvaziamento gástrico e do trânsito intestinal em camundongos. Os animais foram tratados com veículo (água, 0,1 mL/100 g, v.o.), domperidona (20 mg/kg, v.o.), neostigmina (20 μg/kg, s.c.), atropina (3 mg/kg, s.c.), [EHCV e EHCP (1, 3, 10 e 30 mg/kg, v.o.)] e, após 1 hora (v.o.) ou 30 min (s.c.), foi administrado por via oral 0,5 mL do marcador colorido. Transcorridos 15 min desta administração, os animais foram submetidos à eutanásia, a cavidade abdominal foi aberta, o estômago removido, aberto e lavado com 7 mL de água destilada. O conteúdo gástrico coletado foi centrifugado a 450 x g por 15 min e a 150 μL do sobrenadante foi adicionado igual volume de hidróxido de sódio 0,025 N (pH 12) para leitura espectrofotométrica a 560 nm. Um grupo de animais foi eutanasiado imediatamente após a administração do vermelho de fenol, sendo assim considerados com 0% de esvaziamento (tempo zero). Os resultados foram expressos como porcentagem do esvaziamento gástrico em relação ao grupo tempo zero $[100 - (\text{absorbância da amostra} \times 100) / \text{média da absorbância do tempo zero}]$. (SUCHITRA *et al.*, 2003)

Após a retirada do estômago para avaliação do esvaziamento gástrico, o intestino delgado foi removido e, com auxílio de uma régua, foi determinado o comprimento total do intestino de cada animal (distância entre o piloro até a válvula ileocecal) bem como a distância percorrida pelo marcador (até a última porção com pelo menos 1 cm contínuo do marcador). Os resultados foram expressos como porcentagem da distância percorrida pelo marcador em relação ao comprimento total do intestino delgado (SUCHITRA *et al.*, 2003).

3.19 AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA

Na úlcera crônica, durante os sete dias de tratamento oral com o veículo (água – 0,1 ml/100g), omeprazol (20 mg/kg), extratos [EHCV (10 mg/kg) e EHCP (30 mg/kg)] e frações [FAECV (1,8 mg/kg), FAECP (6 mg/kg)], o peso corporal diário dos animais foi registrado e os animais foram observados para detecção de possíveis sinais de toxicidade aguda, como diarreia, piloereção, sialorreia ou óbito (OECD, 1996). No final do experimento, os animais foram eutanasiados e os órgãos selecionados (adrenais, baço, coração, fígado, pulmão, rins, ovários e útero) foram retirados e pesados. O peso dos órgãos foi apresentado como peso relativo $[(\text{peso do órgão}/\text{peso do corpo}) \times 100]$. Amostras de sangue foram coletadas para análise dos seguintes parâmetros: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), creatinina e uréia, utilizando kit comercial (Bioclin, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil).

3.20 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos à análise de normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e representados como a média \pm erro padrão das médias ($n = 6-10$ animais). As diferenças entre as médias foram determinadas através de análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. As análises foram realizadas usando o programa para *Windows*, GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPas Software, San Diego, EUA) e um valor de P menor que 0,05 foi considerado significativo.

4 RESULTADOS

4.1 EFEITO DO EHCV E DO EHCP SOBRE AS LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS POR ETANOL

A administração intraperitoneal do EHCV (0,03 e 0,3 mg/kg) e do EHCP (0,1 e 1 mg/kg), inibiu significativamente a formação das lesões em 83, 92, 72 e 89%, respectivamente, quando comparados ao grupo controle (C: $90,2 \pm 13,0 \text{ mm}^2$) (Fig. 5A e B). O controle positivo do teste, omeprazol (40 mg/kg, v.o.), também foi capaz de reduzir as lesões gástricas em 92%.

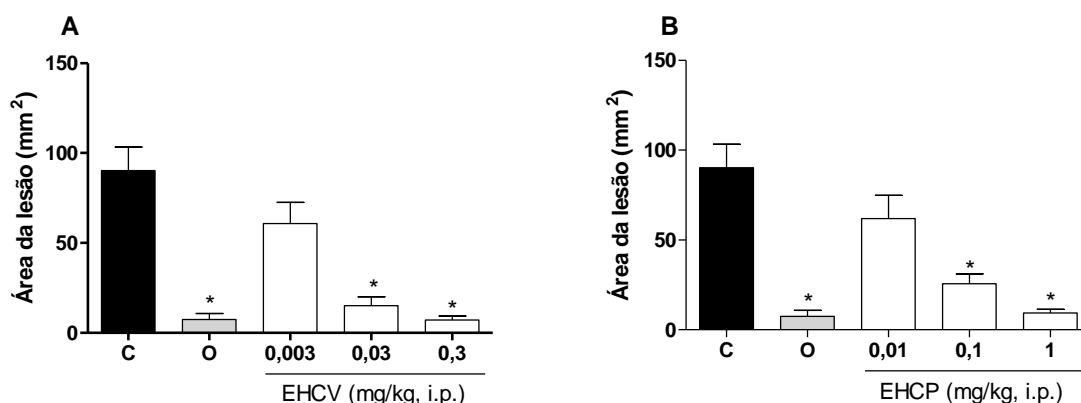


FIGURA 5 - EFEITO DO TRATAMENTO INTRAPERITONEAL COM EHCV (PAINEL A) E COM EHCP (PAINEL B) SOBRE AS LESÕES AGUDAS INDUZIDAS POR ETANOL P.A. EM RATAS. Os animais foram tratados com veículo (C: salina – 0,1 mL/100g), omeprazol (O: 40 mg/kg, v.o.), EHCV (0,003; 0,03 e 0,3 mg/kg) e EHCP (0,01; 0,1 e 1 mg/kg), 30 min antes da administração oral do etanol (0,5 ml/200 g). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão das médias (n=6). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. * Diferente do grupo controle para $P < 0,05$.

4.2 EFEITO DO EHCV E DO EHCP SOBRE O CONTEÚDO DE MUÇO E GSH GÁSTRICOS APÓS A LESÃO INDUZIDA POR ETANOL

A administração de etanol P.A. aos animais diminuiu o conteúdo de muco gástrico em 65% nos animais tratados com veículo, quando comparados ao grupo não lesionado (N: $929,6 \pm 71,9 \text{ } \mu\text{g}$ de Alcian Blue/g de tecido). O pré-tratamento intraperitoneal com EHCV, nas doses de 0,03 e 0,3 mg/kg foi capaz de restabelecer os níveis de muco gástrico para $647,6 \pm$

56,8 e $733,7 \pm 47,1$ μg de Alcian Blue/g de tecido, respectivamente (Fig. 6A), assim como as doses de 0,01 e 1 mg/kg do EHCP, que alteraram significativamente a quantidade de muco para $596,6 \pm 69,9$ e $735,4 \pm 93,8$ μg de Alcian Blue/g de tecido, respectivamente, comparados com o grupo controle (C: $322,9 \pm 40,0$ μg de Alcian Blue/g de tecido) (Fig. 6B). O controle positivo do teste, omeprazol (40 mg/kg, v.o.), restabeleceu os níveis de muco para $829,1 \pm 81,7$ μg de Alcian Blue/g de tecido (Fig. 6A e B).

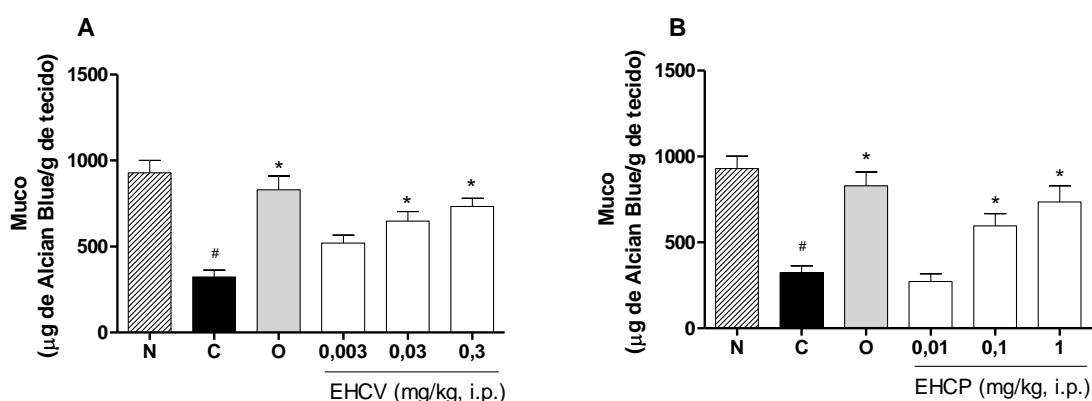


FIGURA 6 - EFEITO DO TRATAMENTO INTRAPERITONEAL COM EHCV (PAINEL A) E EHCP (PAINEL B) SOBRE O CONTEÚDO DE MUCO DA MUCOSA GÁSTRICA APÓS AS LESÕES AGUDAS INDUZIDAS POR ETANOL P.A. EM RATAS. Os animais foram pré-tratados com veículo (C: salina – 0,1 mL/100g), omeprazol (O: 40 mg/kg, v.o.), EHCV (0,003; 0,03 e 0,3 mg/kg) ou EHCP (0,01; 0,1 e 1 mg/kg), 30 min antes da administração oral do etanol (0,5 ml/200 g). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão das médias ($n = 6$). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. # Diferente do grupo não lesionado (N: naive) para $P < 0,05$ e * Diferente do grupo controle para $P < 0,05$.

O tratamento dos animais com etanol P.A. também depletou o conteúdo de GSH da mucosa gástrica em 48% nos animais tratados com veículo, quando comparados ao grupo que não recebeu o etanol (N: $455,5 \pm 63,6$ μg de GSH/g de tecido) (Fig. 7A e B). A administração de EHCV (0,3 mg/kg) e de EHCP (0,01 e 1 mg/kg) porém, foi capaz de restabelecer a quantidade de GSH para $458,4 \pm 34,5$; $421,6 \pm 41,7$ e $437,5 \pm 32,0$ $\mu\text{g/g}$ de tecido, respectivamente, quando comparado ao grupo controle (C: $235,9 \pm 45,2$ $\mu\text{g/g}$ de tecido). O omeprazol (40 mg/kg, v.o.), restabeleceu o conteúdo de GSH para $444,6 \pm 44,4$ $\mu\text{g/g}$ de tecido. (Fig. 7A e B).

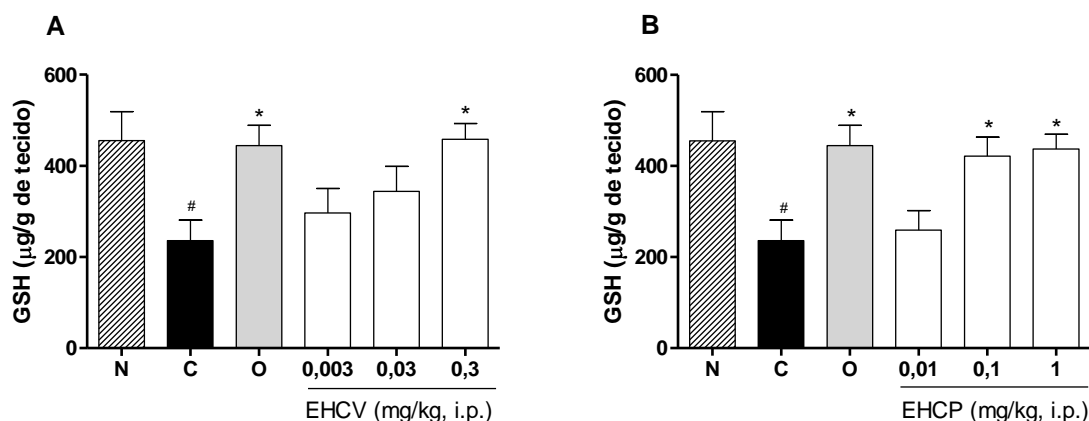


FIGURA 7 - EFEITO DO TRATAMENTO INTRAPERITONEAL COM EHCV (PAINEL A) E EHCP (PAINEL B) SOBRE O CONTEÚDO DE GSH DA MUCOSA GÁSTRICA APÓS AS LESÕES AGUDAS INDUZIDAS POR ETANOL P.A. EM RATAS. Os animais foram pré-tratados com veículo (C: salina – 0,1 mL/100g), omeprazol (O: 40 mg/kg, v.o.), EHCV (0,003; 0,03 e 0,3 mg/kg) e EHCP (0,01; 0,1 e 1 mg/kg), 30 min antes da administração oral do etanol (0,5 ml/200 g). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão das médias (n = 6). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. # Diferente do grupo naíve para $P < 0,05$ e * Diferente do grupo controle para $P < 0,05$.

4.3 EFEITO DO EHCV E DO EHCP SOBRE AS LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS POR INDOMETACINA

O pré-tratamento oral dos animais com EHCV (3,6 mg/kg) e EHCP (10,2 mg/kg) reduziu em 83% e 60%, respectivamente, a área das lesões gástricas induzidas por indometacina, quando comparada ao grupo controle (C: $27,0 \pm 5,7 \text{ mm}^2$) (Fig. 8). De maneira similar, omeprazol (40 mg/kg, v.o.) e a prostaglandina (20 μg/kg, v.o.) também foram capazes de reduzir as lesões em 79% e 97%, respectivamente.

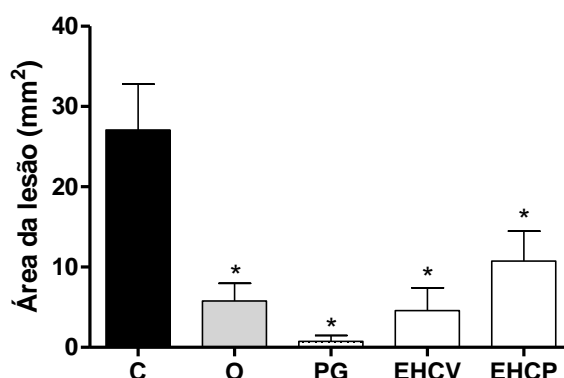


FIGURA 8 - EFEITO DO TRATAMENTO ORAL COM EHCV E EHCP SOBRE AS LESÕES AGUDAS INDUZIDAS POR INDOMETACINA EM RATAS. Os animais foram oralmente tratados com veículo (C: água – 0,1 mL/100g), omeprazol (O: 40 mg/kg), prostaglandina (PG: 20 µg/kg), EHCV (3,6 mg/kg) ou EHCP (10,2 mg/kg), 60 min antes da administração oral da indometacina (80 mg/kg). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão das médias (n = 8). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. * Diferente do grupo controle para $P < 0,05$.

A análise histológica das lesões revela um dano na mucosa gástrica com desorganização tecidual, promovido pela indometacina, no grupo de animais que recebeu apenas o veículo (Fig. 9A). Porém, é possível observar uma melhora na integridade da mucosa nos cortes histológicos dos animais tratados com omeprazol (40 mg/kg), prostaglandina (20 µg/kg), EHCV (3,6 mg/kg) e EHCP (10,2 mg/kg) (Fig. 9C, E, G e I, respectivamente). Quanto ao edema formado na tela submucosa pelo antiinflamatório, não foi possível identificar uma diferença significativa quanto a sua redução entre os animais tratados com o veículo (Fig. 9B) e os tratados com omeprazol, prostaglandina ou extratos (Fig. 9D, F, H e J).

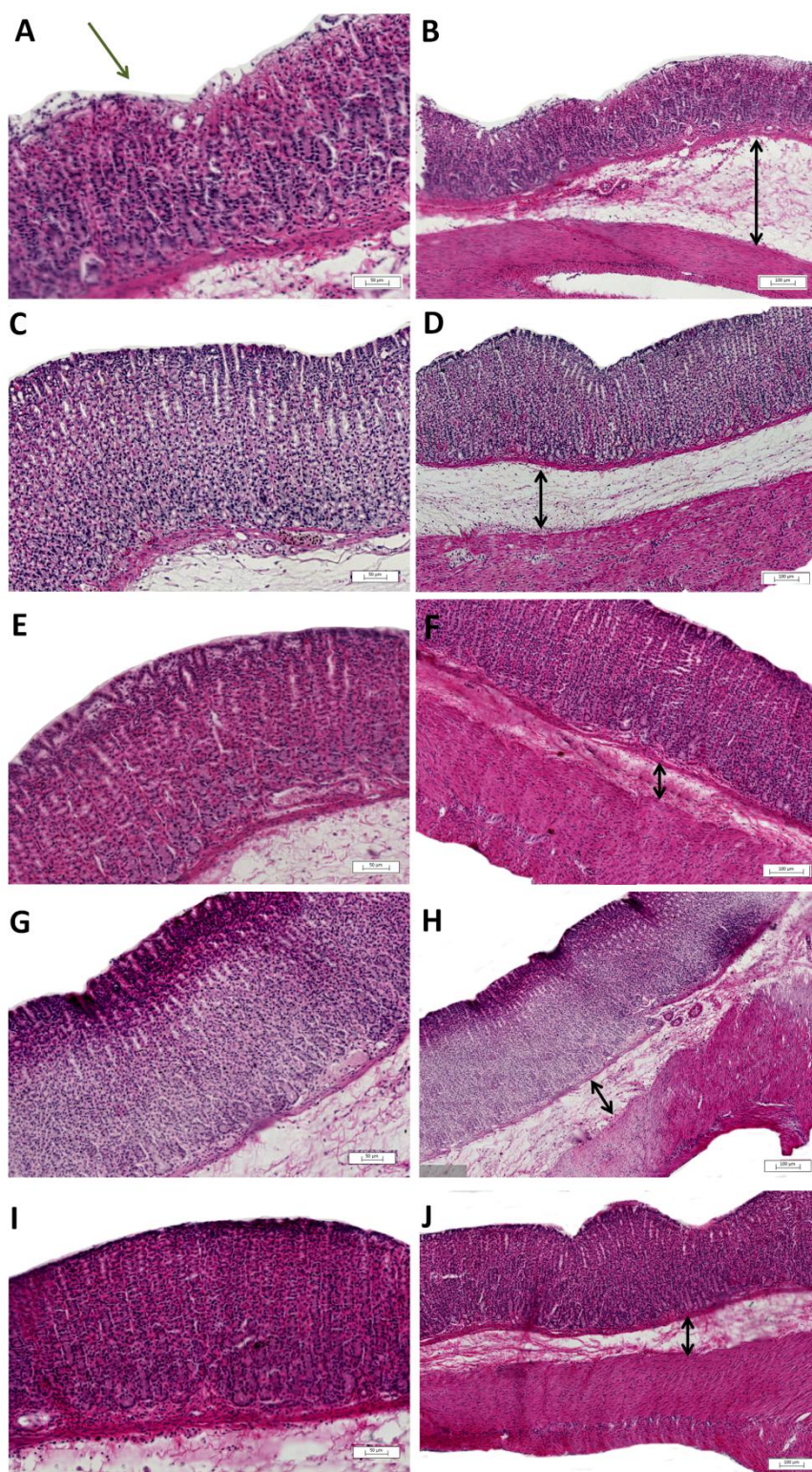


FIGURA 9 - IMAGENS HISTOLÓGICAS REPRESENTATIVAS DA TÚNICA MUCOSA (PAINÉIS A, C, E, G e I) E DO EDEMA NA TELA SUBMUCOSA (PAINÉIS B, D, F, H e J) APÓS LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS POR INDOMETACINA EM RATAS. Os animais foram oralmente tratados com veículo (C: água – 0,1 mL/100g, Painéis A e B), omeprazol (O: 40 mg/kg, Painéis C e D), prostaglandina (PG: 20 μg/kg, Painéis E e F), EHCV (3,6 mg/kg, Painéis G e H) e EHCP (10,2 mg/kg, Painéis I e J) 60 min antes da administração da indometacina. A seta preta indica o dano à mucosa gástrica e o edema na submucosa. Aumento de 100x, escala = 50 μm nos painéis A, C, E, G e I. Aumento de 20x, escala = 100 μm nos painéis B, D, F, H e J.

4.4 EFEITO DAS FRAÇÕES PARTICIONADAS DO EHCV E DO EHCP SOBRE AS LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS POR INDOMETACINA

O tratamento oral dos animais com as frações acetato de etila (FAECV, 0,6 mg/kg) e butanólica (FBuCV, 1 mg/kg) do extrato de chá verde (EHCV) inibiram a área de lesões gástricas em 49% e 53%, respectivamente, em comparação ao grupo controle (C: $48,0 \pm 10,4 \text{ mm}^2$) (Fig. 10A). Além disso, a administração oral das frações acetato de etila (FAECP, 2 mg/kg) e butanólica (FBuCP, 3,2 mg/kg) do extrato de chá preto (EHCP) também reduziu a área lesionada pela indometacina em 53% e 59%, respectivamente, quando comparadas ao grupo controle (C: $47,7 \pm 6,6 \text{ mm}^2$) (Fig. 10B). No entanto, a fração clorofórmica do EHCV (FCICV, 1,2 mg/kg, v.o.), a fração clorofórmica do chá preto (FCICP, 3,2 mg/kg, v.o.), assim como a fração aquosa de ambos extratos (FAqCV 1 mg/kg e FAqCP 1 mg/kg, v.o.) não foram capazes de proteger a mucosa gástrica (Fig. 10A e B). O omeprazol (40 mg/kg, v.o.) e a prostaglandina (20 $\mu\text{g/kg}$, v.o.) inibiram significativamente as lesões gástricas em até 88% e 98% , respectivamente (Fig. 10A e B).

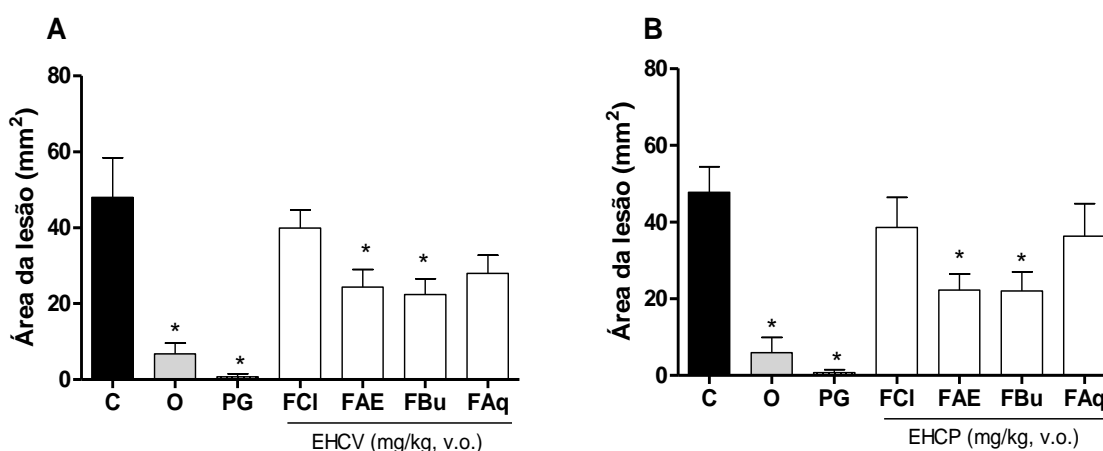


FIGURA 10 - EFEITO DO TRATAMENTO ORAL COM AS FRAÇÕES PARTICIONADAS DO EHCV (PAINEL A) E DO EHCP (PAINEL B) SOBRE AS LESÕES AGUDAS INDUZIDAS POR INDOMETACINA EM RATAS. Os animais foram oralmente tratados com veículo (C: água – 0,1 mL/100g), omeprazol (O: 40 mg/kg), prostaglandina (PG: 20 $\mu\text{g/kg}$), frações do chá verde [FCICV (1,2 mg/kg), FAECV (0,6 mg/kg), FBuCV (1 mg/kg) e FAqCV (1 mg/kg)] ou frações do chá preto [FCICP (3,2 mg/kg), FAECP (2 mg/kg), FBuCP (3,2 mg/kg) e FAqCP (1 mg/kg)], 60 min antes da administração oral da indometacina (80 mg/kg). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão das médias ($n = 6$). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. * Diferente do grupo controle para $P < 0,05$.

Microscopicamente, é possível observar que o tratamento com as frações FAECV (0,6 mg/kg), FBuCV (1 mg/kg), FAECP (2 mg/kg) e FBuCP (3,2 mg/kg) (Fig. 11G, I, K e M, respectivamente) promoveu uma diminuição na ruptura epitelial, quando comparadas ao grupo controle (Fig. 11A). Igualmente, o omeprazol (40 mg/kg) e a prostaglandina (20 µg/kg) reduziram a desorganização tecidual (Fig. 11C e E). Entretanto, também neste conjunto de experimentos, não foi observada diferença entre os grupos quanto ao tamanho do edema na submucosa formado pela indometacina (Fig 11B, D, F, H, J, L e N).

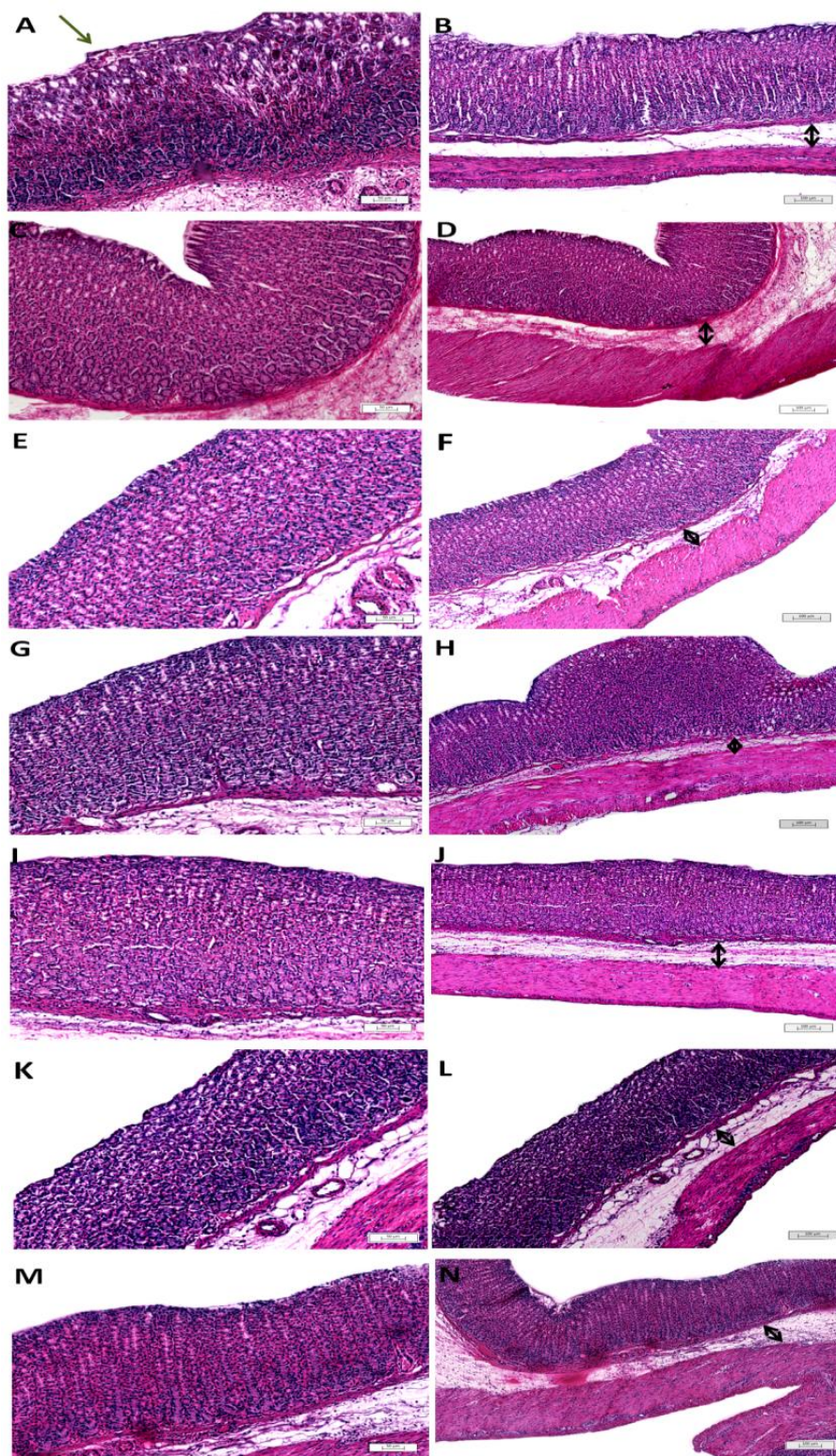


FIGURA 11 - IMAGENS HISTOLÓGICAS REPRESENTATIVAS DA TÚNICA MUCOSA (PAINÉIS A, C, E, G, I, K e M) E DO EDEMA NA TELA SUBMUCOSA (PAINÉIS B, D, F, H, J, L e N) APÓS LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS POR INDOMETACINA EM RATAS. Os animais foram oralmente tratados com veículo (C: água – 0,1 mL/100g, Painéis A e B), omeprazol (O: 40 mg/kg, Painéis C e D), prostaglandina (PG: 20 µg/kg, Painéis E e F), frações do chá verde [(FAECV 0,6 mg/kg, Painéis G e H) e (FBuCV 1 mg/kg, Painéis I e J) ou frações do chá preto [(FAECP 2 mg/kg, Painéis K e L) e (FBuCP (3,2 mg/kg, Painéis M e N)], 60 min antes da administração oral da indometacina. A seta preta indica o dano à mucosa gástrica e o edema na submucosa. Aumento de 100x, escala = 50 µm nos painéis A, C, E, G, I, K e M. Aumento de 20x, escala = 100 µm nos painéis B, D, F, H, J, L e N.

4.5 EFEITO DA EGCG SOBRE LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS POR INDOMETACINA

A administração oral da epigallocatequina galato (EGCG, 204 $\mu\text{g/kg}$) reduziu a área de lesões gástricas em 49%, quando comparada ao grupo controle (C: $167,0 \pm 20,5 \text{ mm}^2$). Similarmente aos experimentos anteriores, o omeprazol (40 mg/kg , v.o.) e a prostaglandina (20 $\mu\text{g/kg}$, v.o.) também reduziram significativamente as lesões gástricas em 91% e 98%, respectivamente (Fig. 12).

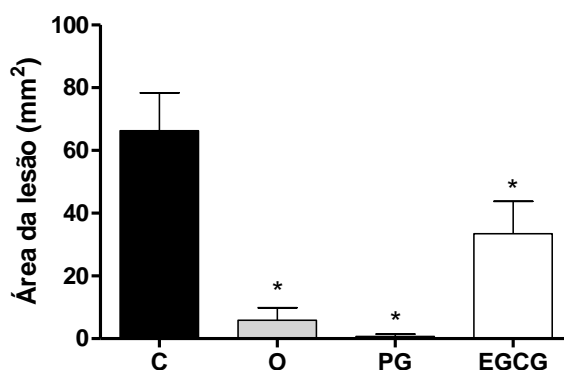


FIGURA 12 - EFEITO DO TRATAMENTO ORAL COM EGCG SOBRE AS LESÕES INDUZIDAS POR INDOMETACINA EM RATAS. Os animais foram oralmente tratados com veículo (C: água – 0,1 mL/100g), omeprazol (O: 40 mg/kg), prostaglandina (PG: 20 $\mu\text{g/kg}$), EGCG (204 $\mu\text{g/kg}$), 60 min antes da administração da indometacina. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão das médias ($n = 6$). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. * Diferente do grupo controle para $P < 0,05$.

O composto EGCG foi capaz de melhorar a organização tecidual e diminuir a descamação epitelial conforme é possível observar através da análise histológica na Fig. 13G, quando comparado aos animais tratados apenas com veículo (Fig. 13A). Porém, não houve diferença significativa entre o grupo controle e o grupo EGCG no edema formado (Fig. 13B e H, respectivamente). O omeprazol (40 mg/kg) e a prostaglandina (20 $\mu\text{g/kg}$), similarmente aos demais experimentos de indução de lesão por indometacina, foram capazes de diminuir a ruptura epitelial e manter a organização tecidual (Fig.13C e E, respectivamente), sem interferir no tamanho do edema formado (Fig. 13D e F, respectivamente).

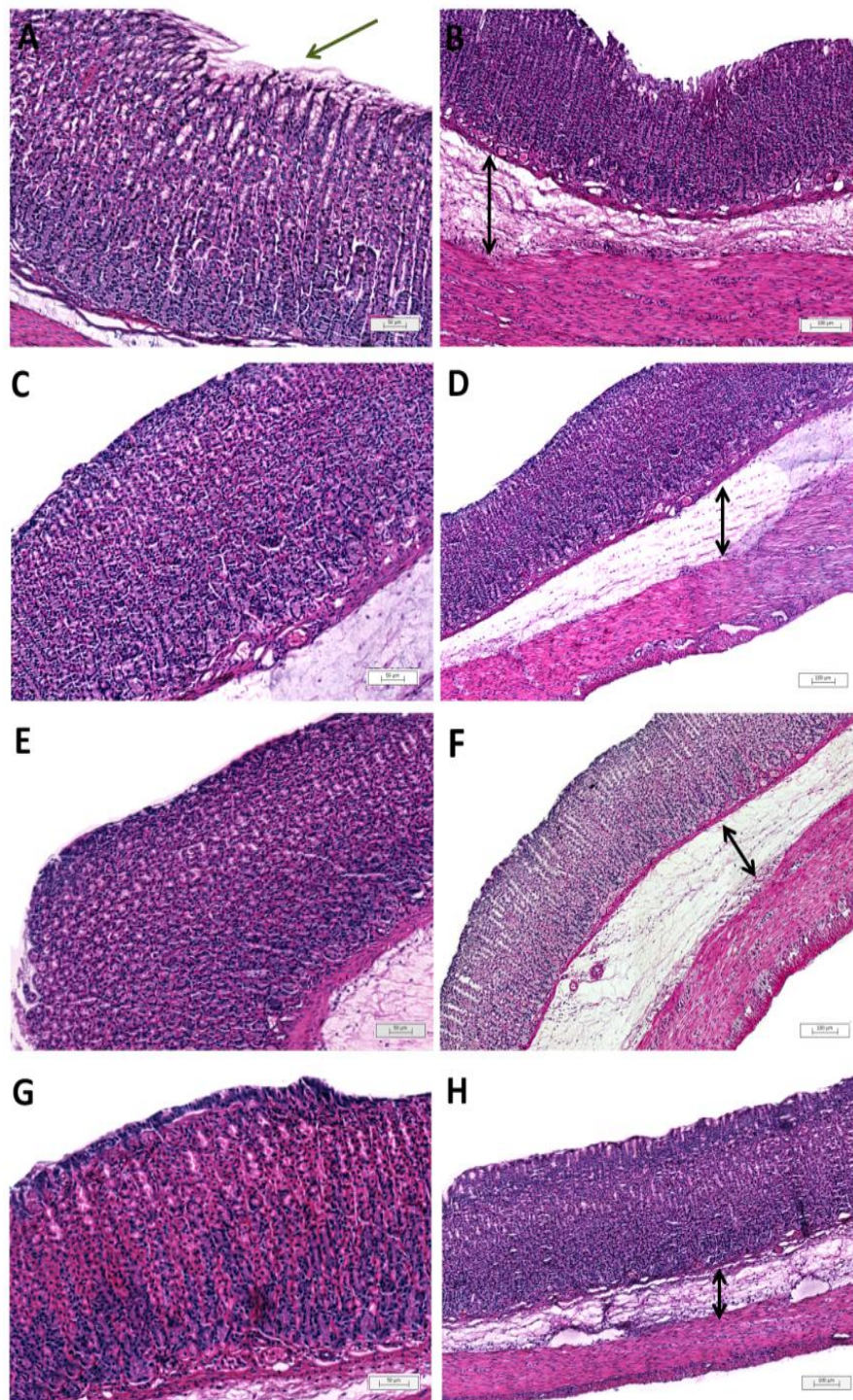


FIGURA 13 - IMAGENS HISTOLÓGICAS REPRESENTATIVAS DA TÚNICA MUCOSA (PAINÉIS A, C, E e G) E DO EDEMA NA TELA SUBMUCOSA (PAINÉIS B, D, F e H) APÓS LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS POR INDOMETACINA EM RATAS. Os animais foram oralmente tratados com veículo (C: água – 0,1 mL/100g, Painéis A e B), omeprazol (O: 40 mg/kg, Painéis C e D), prostaglandina (PG: 20 µg/kg, Painéis E e F) ou EGCG (204 µg/kg, Painéis G e H), 60 min antes da administração oral da indometacina. A seta preta indica o dano à mucosa gástrica e o edema na submucosa. Aumento de 100x, escala = 50 µm nos painéis A, C, E e G. Aumento de 20x, escala = 100 µm nos painéis B, D, F e H.

4.6 EFEITO DO EHCV E DO EHCP SOBRE O CONTEÚDO DE MUCO E GSH GÁSTRICOS APÓS A LESÃO INDUZIDA POR INDOMETACINA

A administração de indometacina (80 mg/kg) aos animais diminuiu o conteúdo de muco gástrico e GSH em 63% e 67%, respectivamente, quando comparados ao grupo não lesionado (N: $1062 \pm 269,1$ μg de Alcian Blue/g de tecido e $174,8 \pm 19,5$ μg de GSH/g de tecido) (Fig. 14A e B). O tratamento oral com EHCV (3,6 mg/kg) e EHCP (10,2 mg/kg) foi capaz de restaurar a quantidade de muco para $891,4 \pm 160,5$ e $921,7 \pm 92,0$ μg de Alcian Blue/g de tecido, respectivamente (Fig. 14A), enquanto que, apenas o EHCP (10,2 mg/kg) alterou significativamente os níveis de GSH para $119,5 \pm 14,7$ μg de GSH/g de tecido (Fig. 14B), quando comparado ao grupo controle (C: $397,2 \pm 55,5$ μg de Alcian Blue/g de tecido e $56,9 \pm 9,5$ μg de GSH/g de tecido). O omeprazol (40 mg/kg, v.o.) e a prostaglandina (20 μg /kg, v.o.) também restabeleceram o conteúdo de muco para $850,0 \pm 114,6$ e $844,8 \pm 107,7$ μg de Alcian Blue/g de tecido, respectivamente, porém o GSH foi alterado apenas pelo omeprazol para $122,5 \pm 26,0$ μg de GSH/g de tecido (Fig. 14A e B).

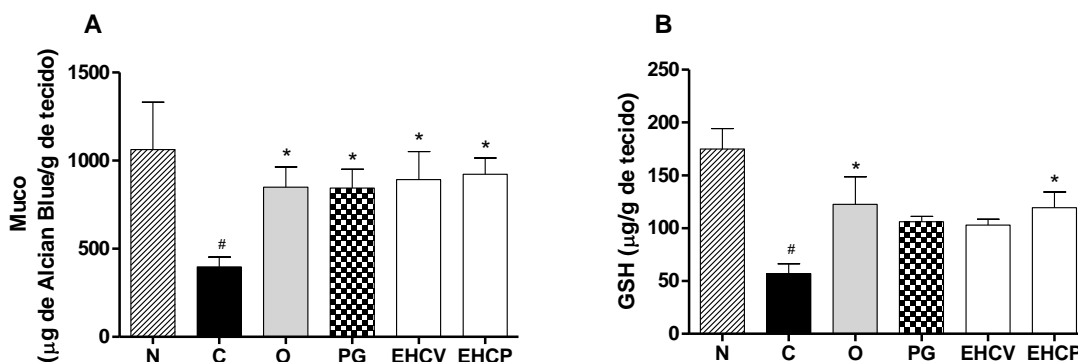


FIGURA 14 - EFEITO DO TRATAMENTO ORAL COM EHCV E EHCP SOBRE O CONTEÚDO DE MUCO (PAINEL A) E DE GSH (PAINEL B) DA MUCOSA GÁSTRICA APÓS AS LESÕES AGUDAS INDUZIDAS POR INDOMETACINA EM RATAS. Os animais foram oralmente tratados com veículo (C: água – 0,1 mL/100g), omeprazol (O: 40 mg/kg), prostaglandina (PG: 20 μg /kg), EHCV (3,6 mg/kg) ou EHCP (10,2 mg/kg), 60 min antes da administração oral da indometacina (80 mg/kg). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão das médias (n = 6). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. # Diferente do grupo naíve para $P < 0,05$ e * Diferente do grupo controle para $P < 0,05$.

4.7 EFEITO DAS FRAÇÕES PARTICIONADAS DO EHCV E DO EHCP SOBRE O CONTEÚDO DE MUCO E GSH GÁSTRICOS APÓS A LESÃO INDUZIDA POR INDOMETACINA

De maneira similar, o conteúdo de muco gástrico também foi depletado em até 59% pela administração de indometacina no experimento utilizando as frações dos extratos, quando comparados ao grupo não lesionado (N: $926,0 \pm 129,8$ μg de Alcian Blue/g de tecido) (Fig. 15 A e B). O pré-tratamento dos animais com a fração FAECV (0,6 mg/kg) (Fig. 15A) e com as frações FAECV (2 mg/kg) e FBuCP (3,2 mg/kg), ambas particionadas do EHCP (Fig. 15B), foram capazes de alterar o conteúdo de muco para $720,4 \pm 62,7$; $714,9 \pm 115,0$ e $710,8 \pm 40,6$ μg de Alcian Blue/g de tecido, respectivamente, em comparação ao grupo controle (C: $382,3 \pm 69,9$ μg de Alcian Blue/g de tecido). O omeprazol (40 mg/kg) assim como a prostaglandina (20 $\mu\text{g/kg}$) também foram capazes de restaurar os níveis de muco (Fig. 15A e B).

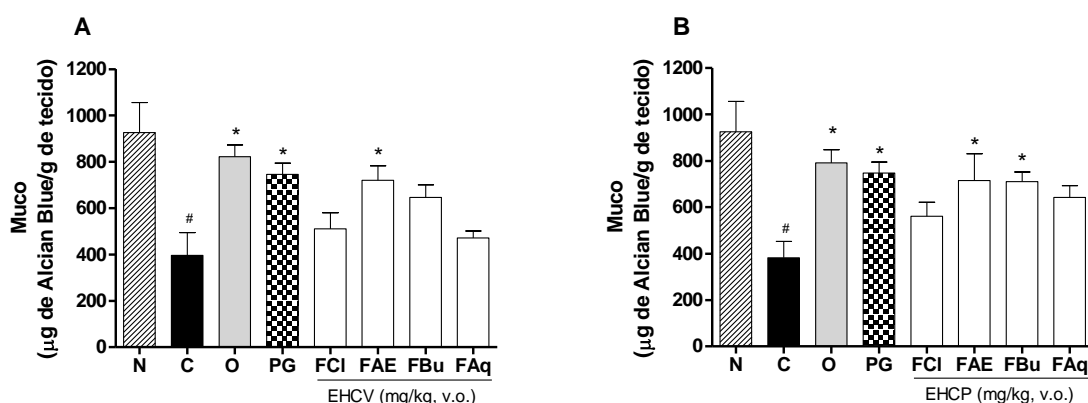


FIGURA 15 - EFEITO DO TRATAMENTO ORAL COM AS FRAÇÕES PARTICIONADAS DO EHCV (PAINEL A) E DO EHCP (PAINEL B) SOBRE O CONTEÚDO DE MUCO DA MUCOSA GÁSTRICA APÓS AS LESÕES AGUDAS INDUZIDAS POR INDOMETACINA EM RATAS. Os animais foram oralmente tratados com veículo (C: água – 0,1 mL/100g), omeprazol (O: 40 mg/kg), prostaglandina (PG: 20 $\mu\text{g/kg}$ /kg), frações do chá verde [FCICV (1,2 mg/kg), FAECV (0,6 mg/kg), FBuCV (1 mg/kg) e FAqCV (1 mg/kg)] ou frações do chá preto [FCICP (3,2 mg/kg), FAECV (2 mg/kg), FBuCP (3,2 mg/kg) e FAqCP (1 mg/kg)], 60 min antes da administração oral da indometacina (80 mg/kg). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão das médias (n = 6). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. # Diferente do grupo naive para $P < 0,05$ e * Diferente do grupo controle para $P < 0,05$.

O tratamento dos animais com indometacina também depletou o conteúdo de GSH em 58% nos animais que receberam apenas o veículo, quando comparados ao grupo não lesionado (N: $156,3 \pm 8,1$ μg de GSH/g de tecido), no experimento utilizando as frações dos extratos (Fig. 16A e B). Apenas a FBUCP (3,2 mg/kg, v.o.), dentre as frações de ambos extratos, foi capaz de restaurar os níveis de GSH para $149,4 \pm 15,8$ μg de GSH/g de tecido, quando comparada ao controle (C: $65,2 \pm 12,7$ μg de GSH/g de tecido) (Fig. 16B). O omeprazol alterou os níveis de GSH para $150,4 \pm 24,1$ μg de GSH/g de tecido (Fig. 16A e B).

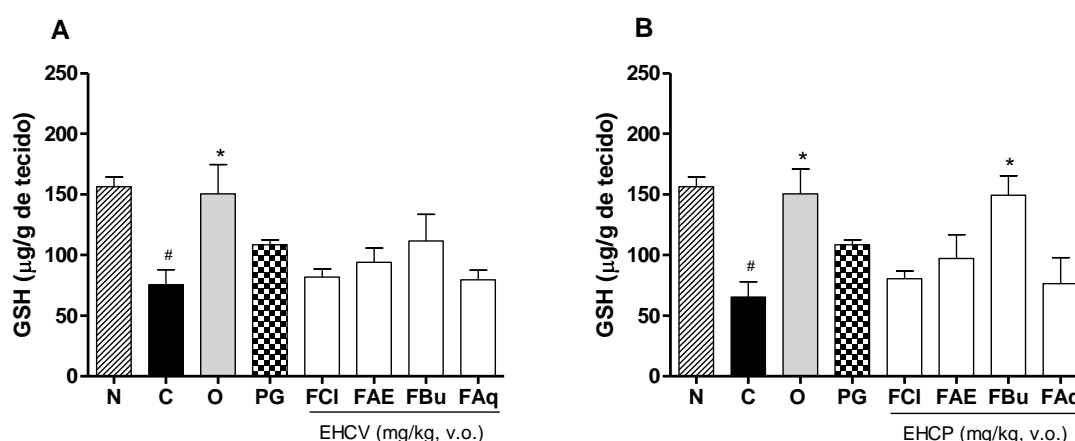


FIGURA 16 - EFEITO DO TRATAMENTO ORAL COM AS FRAÇÕES PARTICIONADAS DO EHCV (PAINEL A) E DO EHCP (PAINEL B) SOBRE O CONTEÚDO DE GSH DA MUCOSA GÁSTRICA APÓS AS LESÕES AGUDAS INDUZIDAS POR INDOMETACINA EM RATAS. Os animais foram oralmente tratados com veículo (C: água – 0,1 mL/100g), omeprazol (O: 40 mg/kg), prostaglandina (PG: 20 $\mu\text{g/kg}$ /kg), frações do chá verde [FCICV (1,2 mg/kg), FAECV (0,6 mg/kg), FBuCV (1 mg/kg) e FAqCV (1 mg/kg)] ou frações do chá preto [FCICP (3,2 mg/kg), FAECP (2 mg/kg), FBuCP (3,2 mg/kg) e FAqCP (1 mg/kg)], 60 min antes da administração oral da indometacina (80 mg/kg). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão das médias (n = 6). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. # Diferente do grupo naive para $P < 0,05$ e * Diferente do grupo controle para $P < 0,05$.

4.8 EFEITO DA EGCG SOBRE O CONTEÚDO DE MUCO E GSH GÁSTRICOS APÓS LESÃO INDUZIDA POR INDOMETACINA

Conforme esperado, a indometacina depletou o conteúdo de muco gástrico em 57% e o de GSH em 52%, comparado ao grupo de animais não lesionados (N: $926 \pm 129,8$ μg de Alcian Blue/g de tecido e $156,3 \pm 8,1$ μg de GSH/g de tecido) (Fig. 17A e B). A administração da EGCG na dose de 204 $\mu\text{g/kg}$ v.o., não preveniu a depleção de muco da parede gástrica e dos níveis de GSH, quando comparada ao controle (C: $396,3 \pm 98,8$ μg de Alcian Blue/g de tecido e $75,4 \pm 12,5$ de GSH/g de tecido) (Fig. 17A e B). Já o omeprazol (40

mg/kg, v.o.) e a prostaglandina (20 µg/kg, v.o.) mantiveram a quantidade de muco em $822,4 \pm 50,5$ e $744,9 \pm 49,4$ µg de Alcian Blue/g de tecido, respectivamente (Fig. 17A), porém o GSH foi alterado apenas pelo omeprazol para $150,4 \pm 24,1$ µg de GSH/g de tecido (Fig. 17B).

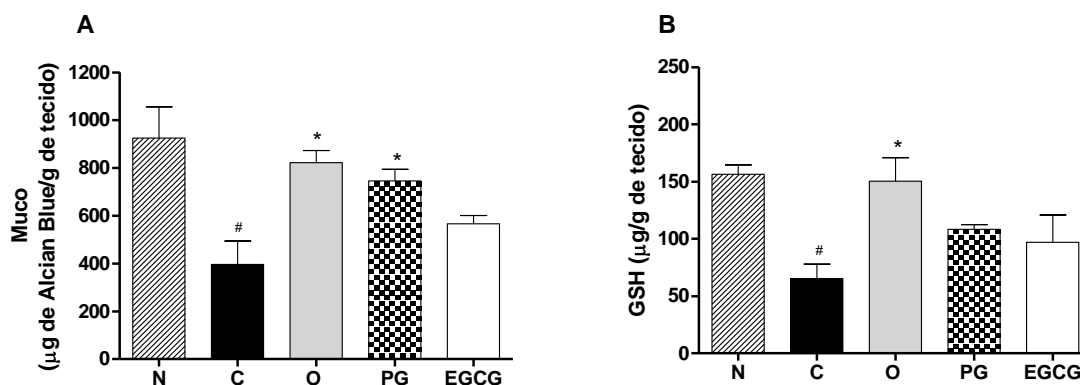


FIGURA 17 - EFEITO DO TRATAMENTO ORAL COM EGCG SOBRE O CONTEÚDO DE MUCO (PAINEL A) E DE GSH (PAINEL B) DA MUCOSA GÁSTRICA APÓS AS LESÕES AGUDAS INDUZIDAS POR INDOMETACINA EM RATAS. Os animais foram oralmente tratados com veículo (C: água – 0,1 mL/100g), omeprazol (O: 40 mg/kg), prostaglandina (PG: 20 µg/kg), EGCG (204 µg/kg), 60 min antes da administração da indometacina (80 mg/kg). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão das médias ($n = 6$). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. # Diferente do grupo naïve para $P < 0,05$ e * Diferente do grupo controle para $P < 0,05$.

4.9 EFEITO DO EHCV E DO EHCP SOBRE A SECREÇÃO GÁSTRICA BASAL E ATIVIDADE PÉPTICA

A administração do EHCV (1, 3 e 10 mg/kg, i.d.; 10 mg/kg, v.o. ou 1 mg/kg, i.p.) ou do EHCP (3, 10 e 30 mg/kg, i.d.; 30 mg/kg, v.o. ou 3 mg/kg, i.p.) não foi capaz de alterar o volume e a acidez total do conteúdo gástrico produzido durante 4 h. O omeprazol, controle positivo do teste, inibiu o volume gástrico e a acidez total em até 51% e 84%, respectivamente, quando comparado com o controle (C: $10,8 \pm 0,5$ mL e $0,074 \pm 0,005$ mEq[H⁺]/mL) (Tabela 1). Em relação à atividade péptica, o tratamento com EHCV (1 e 10 mg/kg) ou EHCP (3 ou 30 mg/kg) pela via intraduodenal, oral ou intraperitoneal, não foi capaz de reduzir significativamente este parâmetro, em comparação ao controle (C: $431,8 \pm 42,3$ µmol de tirosina/mL/4h). Como esperado, o omeprazol (40 mg/kg) diminuiu também a atividade péptica da secreção gástrica em 55%, quando comparado ao controle (Tabela 1).

TABELA 1 - EFEITO DOS EHCV E EHCP NOS PARÂMETROS DO CONTEÚDO GÁSTRICO E NA ATIVIDADE PÉPTICA APÓS LIGADURA DO PILORO

Via de administração	Tratamento	Volume (mL)	Acidez gástrica (mEq[H ⁺]/mL)	Atividade péptica (μmol de tirosina/mL/4h)
Intraduodenal	Controle (0,1mL/100g)	10,8 ± 0,5	0,074 ± 0,005	431,8 ± 42,3
	Omeprazol (40 mg/kg)	5,2 ± 0,2 *	0,012 ± 0,001 *	193,1 ± 49,6 *
	EHCV (1 mg/kg)	10,9 ± 0,7	0,076 ± 0,004	-
	EHCV (3 mg/kg)	11,5 ± 0,6	0,079 ± 0,001	-
	EHCV (10 mg/kg)	10,0 ± 0,6	0,056 ± 0,006	427,1 ± 23,9
	EHCP (3 mg/kg)	11,0 ± 0,9	0,076 ± 0,004	-
	EHCP (10 mg/kg)	11,4 ± 0,7	0,079 ± 0,001	-
	EHCP (30 mg/kg)	9,2 ± 0,6	0,056 ± 0,006	364,8 ± 70,4
Oral	Controle (0,1 mL/100g)	8,1 ± 0,5	0,075 ± 0,005	431,8 ± 42,3
	Omeprazol (40 mg/kg)	4,1 ± 0,2 *	0,016 ± 0,002 *	193,1 ± 49,6 *
	EHCV (10 mg/kg)	7,2 ± 0,5	0,076 ± 0,003	398,8 ± 7,8
	EHCP (30 mg/kg)	6,5 ± 0,5	0,074 ± 0,006	410,6 ± 29,6
Intraperitoneal	Controle (0,1 mL/100g)	8,1 ± 0,8	0,072 ± 0,004	431,8 ± 42,3
	Omeprazol (40 mg/kg)	4,1 ± 0,2 *	0,016 ± 0,002 *	193,1 ± 49,6 *
	EHCV (1 mg/kg)	6,8 ± 0,4	0,072 ± 0,005	399,7 ± 20,9
	EHCP (3 mg/kg)	6,6 ± 0,5	0,078 ± 0,005	379,9 ± 44,8

Os resultados estão expressos como média ± erro padrão das médias (n=6). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. * $P < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

4.10 EFEITO DO EHCV E DO EHCP SOBRE A ÚLCERA GÁSTRICA CRÔNICA INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO

A administração oral do EHCV (3, 10 e 30 mg/kg) duas vezes ao dia durante sete dias reduziu significativamente a úlcera gástrica crônica induzida pelo ácido acético em 32%, 63% e 71%, respectivamente (Fig. 18A). O EHCP nas doses de 30 e 100 mg/kg também diminuiu a área da úlcera em 56% e 52%, respectivamente (Fig. 18B). O controle positivo para redução da lesão, omeprazol (20 mg/kg), reduziu a área da úlcera em 65% quando comparado ao grupo controle (C: $146,3 \pm 9,0 \text{ mm}^2$) (Fig. 18A e B).

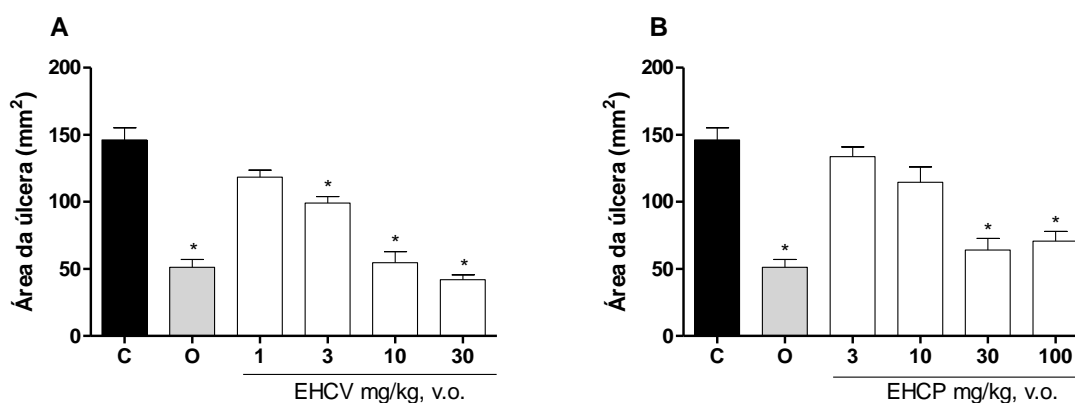


FIGURA 18 - EFEITO DO EHCV (PAINEL A) E DO EHCP (PAINEL B) SOBRE A ÚLCERA GÁSTRICA CRÔNICA INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO 80% EM RATAS. Os animais foram tratados pela via oral com veículo (C: água – 0,1 mL/100g), omeprazol (O: 20 mg/kg), EHCV (1, 3, 10 e 30 mg/kg) ou EHCP (3, 10, 30 e 100 mg/kg) duas vezes ao dia durante sete dias a partir do segundo dia após a indução da úlcera. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão das médias ($n = 8-10$). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. * Diferente do grupo controle para $P < 0,05$.

É possível observar histologicamente (Fig. 19B) a extensa lesão promovida pelo ácido acético, com as margens e base da úlcera bem definidas, enquanto que nos animais tratados oralmente com omeprazol (20 mg/kg), EHCV (10 mg/kg) e EHCP (30 mg/kg), houve uma diminuição da área da úlcera quando comparados ao grupo controle (Fig. 19D, F e H, respectivamente).

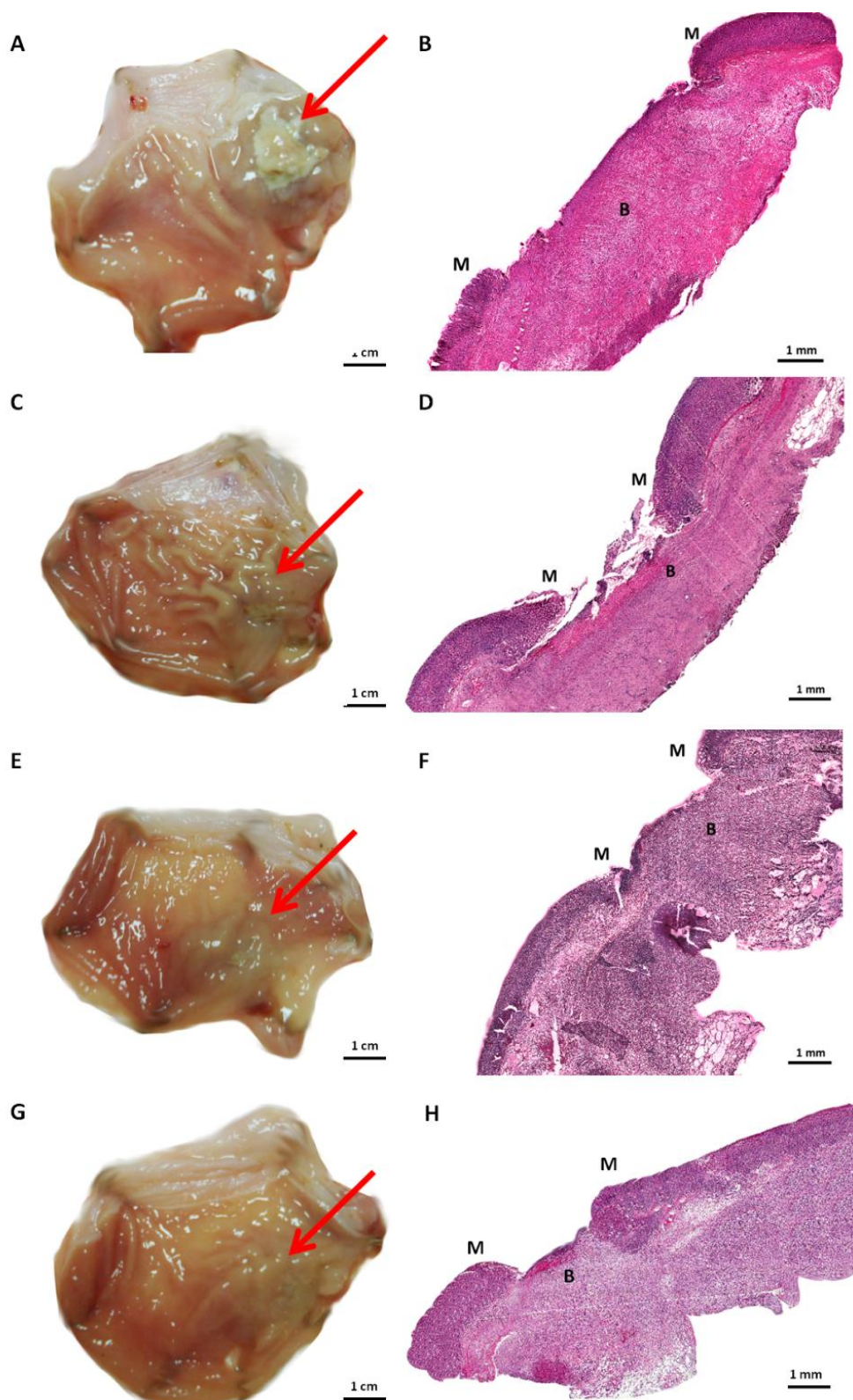


FIGURA 19 - ANÁLISE MACROSCÓPICA (PAINÉIS A, C, E e G) E MICROSCÓPICA (PAINÉIS B, D, F e H) DAS ÚLCERAS GÁSTRICAS CRÔNICAS INDUZIDAS POR ÁCIDO ACÉTICO 80% EM RATAS. Os animais foram tratados pela via oral com veículo (C: água – 0,1 mL/100g, Painéis A e B), omeprazol (O: 20 mg/kg, Painéis C e D), EHCV (10 mg/kg, Painéis E e F) e EHCP (30 mg/kg, Painéis G e H) duas vezes ao dia durante sete dias a partir do segundo dia após a indução da úlcera. M: margem da úlcera; B: base da úlcera.

4.11 EFEITO DAS FRAÇÕES FAECV, FAqCP E FAECP SOBRE A ÚLCERA GÁSTRICA CRÔNICA INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO

O tratamento oral duas vezes ao dia durante sete dias com as frações FAECV (1,8 mg/kg), FAECP (6 mg/kg) e com o omeprazol (20 mg/kg) reduziu a área da úlcera induzida pelo ácido acético em 70%, 63% e 75%, respectivamente, quando comparados aos animais que foram tratados com veículo (C: $138,8 \pm 16,1 \text{ mm}^2$) (Fig. 20A e B). Entretanto, o tratamento dos animais pela via oral com a fração FAqCP (3 mg/kg) não interferiu de forma significativa no processo de cicatrização da úlcera (Fig. 20B).

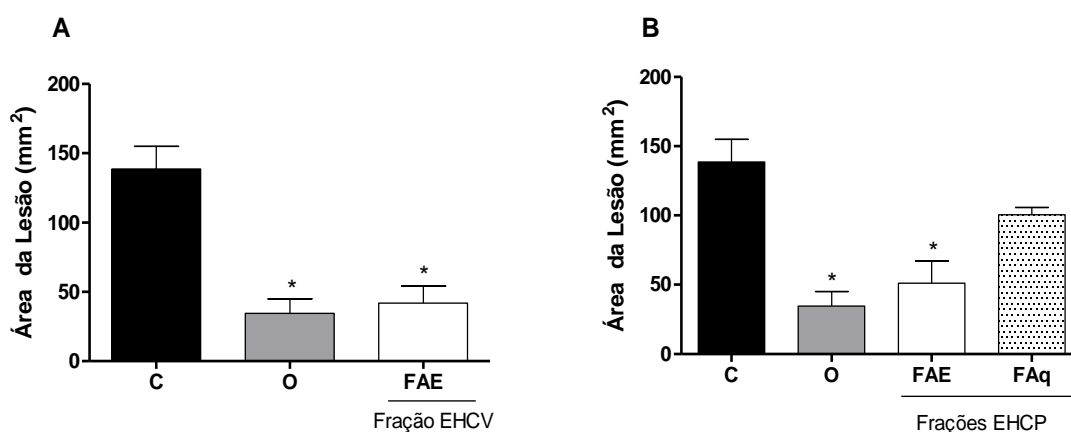


FIGURA 20 - EFEITO DA FAECV (PAINEL A) E DAS FRAÇÕES FAECP E FAqCP (PAINEL B) SOBRE A ÚLCERA GÁSTRICA CRÔNICA INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO 80% EM RATAS. Os animais foram tratados pela via oral com veículo (C: água – 0,1 mL/100g), omeprazol (O: 20 mg/kg), FAECV (1,8 mg/kg), FAECP (6 mg/kg) ou FAqCP (3 mg/kg) duas vezes ao dia durante sete dias a partir do segundo dia após a indução da úlcera. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão das médias ($n = 8$). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. * Diferente do grupo controle para $P < 0,05$.

Na Fig. 21A e B é possível observar macro e microscopicamente a úlcera profunda formada pelo ácido acético em animais tratados apenas com o veículo, enquanto que naqueles que receberam omeprazol (20 mg/kg), FAECV (1,8 mg/kg) e FAECP (6 mg/kg), houve um aumento na cicatrização gástrica (Fig. 21C, E e G, respectivamente). A análise microscópica reforça a redução da lesão nos cortes com a úlcera de animais tratados com omeprazol (20 mg/kg), FAECV (1,8 mg/kg) e FAECP (6 mg/kg) (Fig. 21D, F e H, respectivamente) quando comparados ao controle (Fig. 21B).

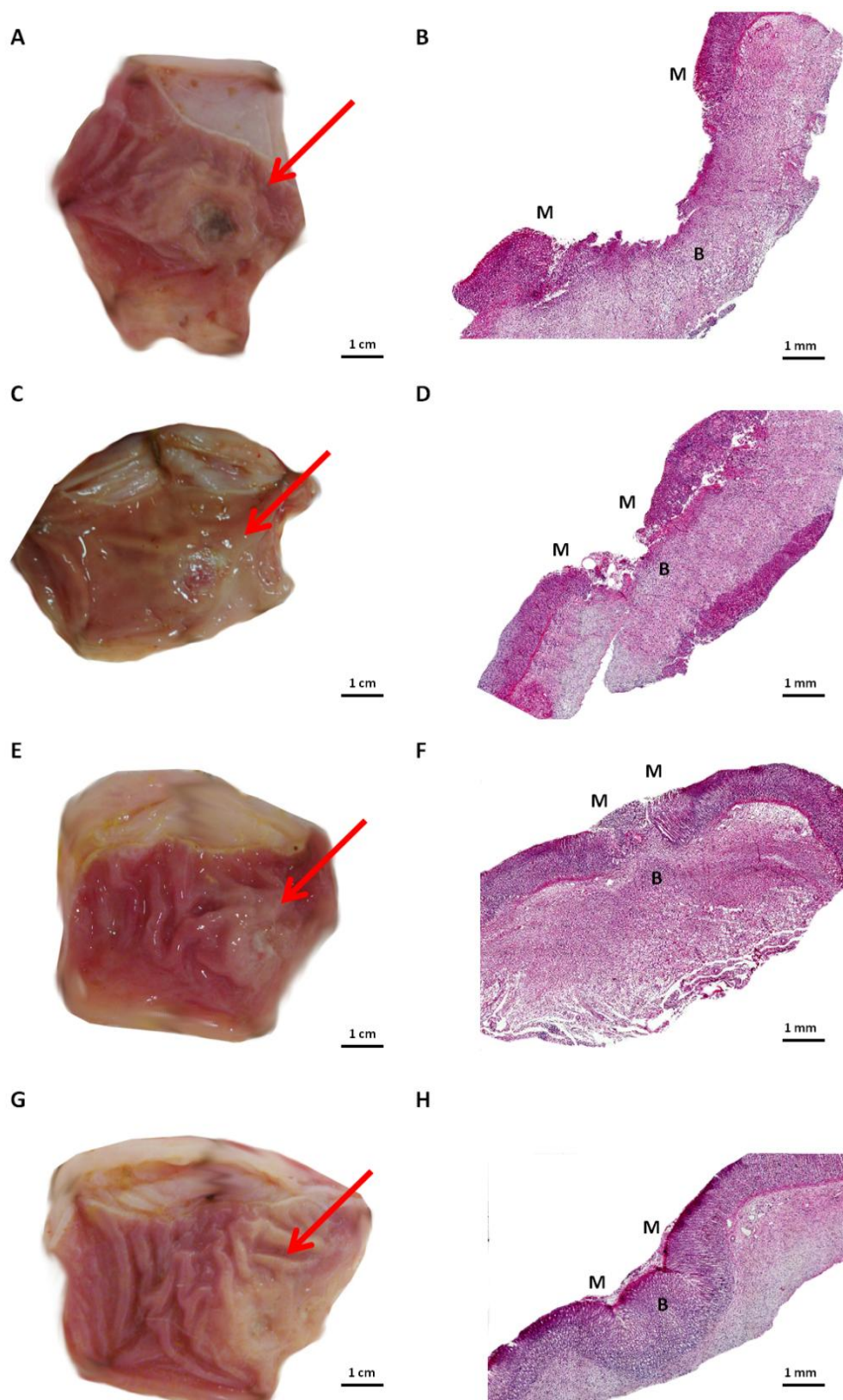


FIGURA 21 - ANÁLISE MACROSCÓPICA (PAINÉIS A, C, E e G) E MICROSCÓPICA (PAINÉIS B, D, F e H) DAS ÚLCERAS GÁSTRICAS CRÔNICAS INDUZIDAS POR ÁCIDO ACÉTICO 80% EM RATAS. Os animais foram tratados pela via oral com veículo (C: água – 0,1 mL/100g, Painéis A e B), omeprazol (O: 20 mg/kg, Painéis C e D), FAECV (1,8 mg/kg, Painéis E e F) e FAECP (6 mg/kg, Painéis G e H) duas vezes ao dia durante sete dias a partir do segundo dia após a indução da úlcera. M: margem da úlcera; B: base da úlcera.

Coletivamente, os dados macroscópicos e microscópicos demonstraram uma aceleração na cicatrização da úlcera nos animais tratados com omeprazol (O: 20 mg/kg, Fig. 19 e 20C e D), EHCV (10 mg/kg, Fig. 19E e F), EHCP (30 mg/kg, Fig. 19G e H), FAECV (1,8 mg/kg, Fig. 20E e F) e FAECP (6 mg/kg, Fig. 20G e H) comparados com o grupo tratado apenas com o veículo (Fig. 19 e 20A e B).

4.12 EFEITO DA EGCG SOBRE A ÚLCERA GÁSTRICA CRÔNICA INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO

De todos os extratos ou frações testados, a fração acetato de etila do EHCV (FAECV) foi a que apresentou o melhor resultado de proteção e cicatrização gástrica em termos de dose-resposta, e sendo ela rica em catequinas, nós avaliamos o potencial de ação anti-úlcera da epigallocatequina-3-O-galato (EGCG), seu componente majoritário.

Nossos resultados demonstraram que, a administração oral, duas vezes ao dia durante sete dias da EGCG na dose de 612 $\mu\text{g/kg}$ não foi capaz de interferir no processo de cicatrização da úlcera (Fig. 22). Já o omeprazol, também neste experimento, foi capaz de reduzir a área da úlcera induzida pelo ácido acético em 49%, quando comparado ao controle (C: $90,6 \pm 9,7 \text{ mm}^2$) (Fig. 22).

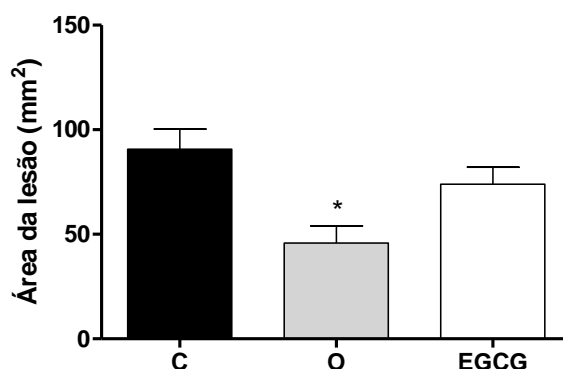


FIGURA 22 - EFEITO DA EGCG SOBRE A ÚLCERA GÁSTRICA CRÔNICA INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO 80% EM RATAS. Os animais foram tratados pela via oral com veículo (C: água – 0,1 mL/100g), omeprazol (O: 20 mg/kg) ou EGCG (612 $\mu\text{g/kg}$) duas vezes ao dia durante sete dias a partir do segundo dia após a indução da úlcera. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão das médias ($n = 8$). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. * Diferente do grupo controle para $P < 0,05$.

4.13 EFEITO DO EHCV E DO EHCP SOBRE O CONTEÚDO DE MUCINA APÓS A INDUÇÃO DE ÚLCERA GÁSTRICA CRÔNICA POR ÁCIDO ACÉTICO

Na úlcera induzida por ácido acético (80%) foi possível observar que, nos animais que receberam apenas o veículo, houve uma diminuição da quantidade de glicoproteínas que compõem o muco (mucinas) (Fig. 23A). No entanto, nos animais tratados oralmente com omeprazol (20 mg/kg), EHCV (10 mg/kg) e EHCP (30 mg/kg) houve um aumento na coloração de PAS para mucina em 82%, 69% e 64%, respectivamente (Fig. 23B, C e D, respectivamente), em comparação com o grupo controle (C: $11,7 \pm 1,5$ pixels/campo $\times 10^4$) (Tabela 2).

TABELA 2 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE EHCV E EHCP NO CONTEÚDO DE MUCINAS PELO MÉTODO HISTOQUÍMICO DE COLORAÇÃO PAS EM ÚLCERA GÁSTRICA CRÔNICA INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO 80% EM RATAS

Tratamento	Mucinas coradas pelo PAS (pixels/campo $\times 10^4$)
Controle (0,1 mL/100g)	$11,7 \pm 1,5$
Omeprazol (20 mg/kg)	$21,4 \pm 3,1$ *
EHCV (10 mg/kg)	$19,8 \pm 1,4$ *
EHCP (30 mg/kg)	$19,2 \pm 1,7$ *

Os resultados estão expressos como a média \pm erro padrão das medias (n=6). A comparação entre os grupos foi realizada através de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. * $P < 0.05$ quando comparado com o grupo controle.

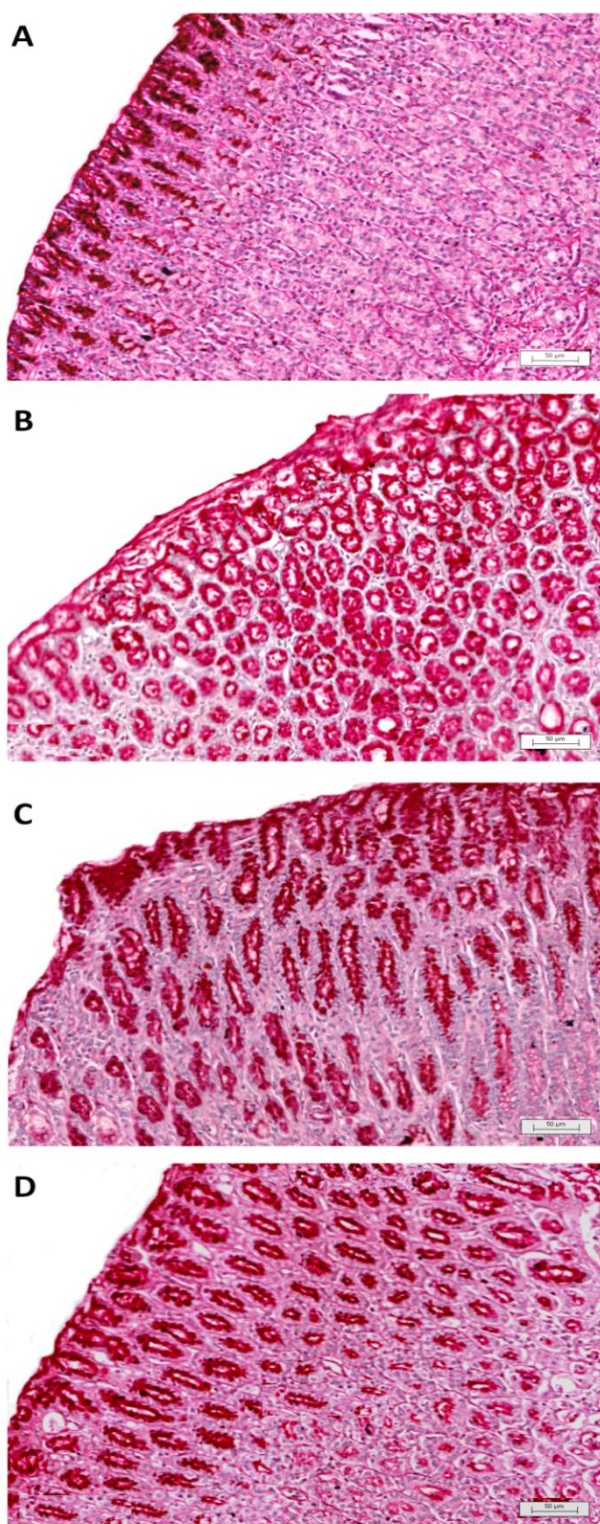


FIGURA 23 - EFEITO DO EHCV E EHCP NO CONTEÚDO DE MUCINAS PELO MÉTODO HISTOQUÍMICO DE COLORAÇÃO PAS EM ÚLCERA GÁSTRICA CRÔNICA INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO 80% EM RATAS. Imagens representativas da margem da úlcera de animais tratados oralmente com veículo (C: água – 0,1 mL/100g, Painel A), omeprazol (O: 20 mg/kg, Painel B), EHCV (10 mg/kg, Painel C) e EHCP (30 mg/kg, Painel D) duas vezes ao dia, durante sete dias a partir do segundo dia após a indução da úlcera. Aumento de 100x, escala = 50 µm.

4.14 EFEITO DAS FRAÇÕES FAECV e FAECP SOBRE O CONTEÚDO DE MUCINA APÓS A INDUÇÃO DE ÚLCERA GÁSTRICA CRÔNICA POR ÁCIDO ACÉTICO

Nos animais tratados com FAECV (1,8 mg/kg, v.o.) ou com FAECP (6 mg/kg, v.o.) também houve um aumento nos níveis de mucina em 77% e 94%, respectivamente (Tabela 3) evidenciados pelo aumento da coloração de PAS (Fig. 24C e D, respectivamente), quando comparados ao controle (C: $10,3 \pm 1,6$ pixels/campo $\times 10^4$) (Fig. 24A). O omeprazol (20 mg/kg, v.o.) neste conjunto de experimentos (Fig. 24B) aumentou os níveis de mucinas em 89%, quando comparado ao controle (Tabela 3).

TABELA 3 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE FAECV E FAECP NO CONTEÚDO DE MUCINAS PELO MÉTODO HISTOQUÍMICO DE COLORAÇÃO PAS EM ÚLCERA GÁSTRICA CRÔNICA INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO 80% EM RATAS.

Tratamento	Mucinas coradas pelo PAS (pixels/campo $\times 10^4$)
Controle (0,1 mL/100g)	$10,3 \pm 1,6$
Omeprazol (20 mg/kg)	$19,5 \pm 2,7 *$
FAECV (1,8 mg/kg)	$18,3 \pm 0,8 *$
FAECP (6 mg/kg)	$20,0 \pm 1,8 *$

Os resultados estão expressos como a média \pm erro padrão das medias (n=6). A comparação entre os grupos foi realizada através de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle.

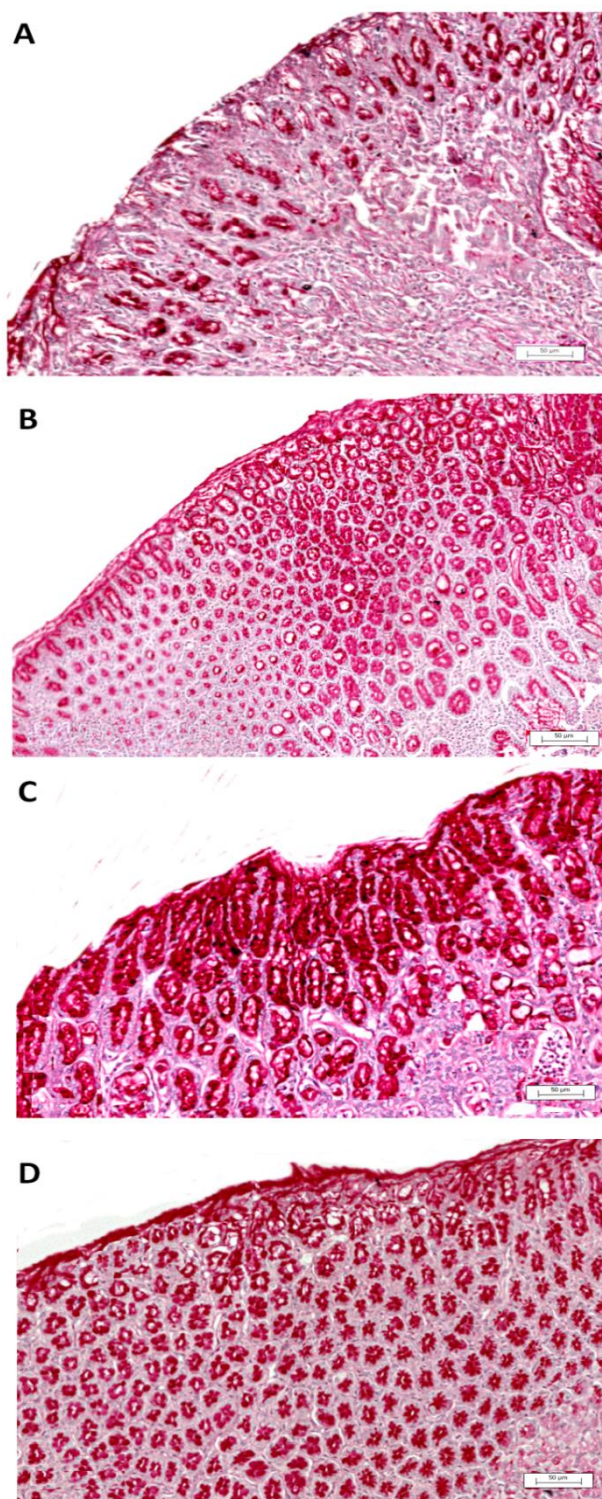


FIGURA 24 - EFEITO DA FAECV E FAECP NO CONTEÚDO DE MUCINAS PELO MÉTODO HISTOQUÍMICO DE COLORAÇÃO PAS EM ÚLCERA GÁSTRICA CRÔNICA INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO 80% EM RATAS. Imagens representativas da margem da úlcera de animais tratados oralmente com veículo (C: água – 0,1 mL/100g, Painel A), omeprazol (O: 20 mg/kg, Painel B), FAECV (1,8 mg/kg, Painel C) e FAECP (6 mg/kg, Painel D) duas vezes ao dia, durante sete dias a partir do segundo dia após a indução da úlcera. Aumento de 100x, escala = 50 µm.

4.15 EFEITO DO EHCV E DO EHCP SOBRE OS NÍVEIS DE GSH E LOOH APÓS A INDUÇÃO DE ÚLCERA GÁSTRICA CRÔNICA POR ÁCIDO ACÉTICO

Na úlcera crônica, o ácido acético diminuiu o conteúdo de GSH em 59% e aumentou a quantidade de LOOH em 30%, em relação ao grupo não ulcerado (Naive: $542,4 \pm 44,8$ $\mu\text{g/g}$ de tecido e $38,2 \pm 2,8$ mmol/mg de tecido). Porém, o tratamento com EHCV (10 mg/kg, v.o.), restaurou os níveis de GSH e diminuiu os níveis de LOOH para $528,7 \pm 41,2$ $\mu\text{g/g}$ de tecido e $21,6 \pm 2,3$ mmol/mg de tecido, respectivamente, quando comparado ao grupo controle (Fig. 25A e B). Da mesma forma, o EHCP (30 mg/kg) preveniu a depleção de GSH para $428,4 \pm 36,8$ $\mu\text{g/g}$ de tecido e depletou a quantidade de LOOH para $37,1 \pm 3,7$ mmol/mg de tecido (Fig. 25A e B). O omeprazol, controle positivo do teste, também foi capaz de alterar os níveis de GSH para $393,0 \pm 48,0$ $\mu\text{g/g}$ de tecido e diminuir LOOH para $34,7 \pm 3,1$ mmol/mg de tecido (Fig. 25A e B).

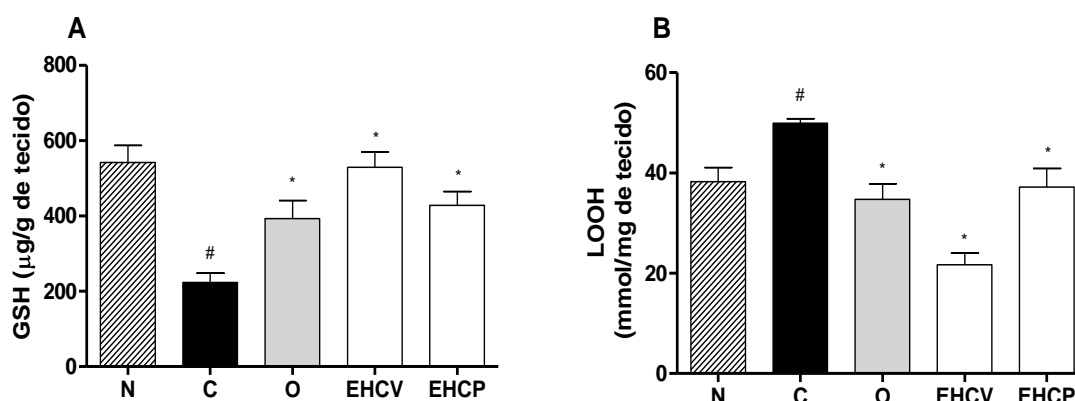


FIGURA 25 - EFEITO DO EHCV E DO EHCP NOS NÍVEIS DE GSH (PAINEL A) E DE LOOH (PAINEL B) APÓS INDUÇÃO DE ÚLCERA CRÔNICA COM ÁCIDO ACÉTICO 80% EM RATAS. Os animais foram tratados pela via oral com veículo (C: água – 0,1 mL/100g), omeprazol (O: 20 mg/kg), EHCV (10 mg/kg) ou EHCP (30mg/kg) duas vezes ao dia durante sete dias a partir do segundo dia após a indução da úlcera. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão das médias (n=6). A comparação estatística foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. # $P < 0,05$ quando comparado ao grupo não lesionado (N: Naive). * $P < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

4.16 EFEITO DAS FRAÇÕES FAECV E FAECP SOBRE OS NÍVEIS DE GSH E LOOH APÓS A INDUÇÃO DE ÚLCERA GÁSTRICA CRÔNICA POR ÁCIDO ACÉTICO

Em outro conjunto de experimentos, o tratamento oral com as frações FAECV (1,8 mg/kg, v.o.), FAECP (6 mg/kg, v.o.) e com o controle positivo do teste (omeprazol 20 mg/kg, v.o.) manteve os níveis de GSH em $415,4 \pm 58,9$; $306,8 \pm 34,2$ e $381,1 \pm 44,2$ $\mu\text{g/g}$ de tecido,

respectivamente (C: $156,5 \pm 35,0$ $\mu\text{g/g}$ de tecido) (Fig. 26A). A fração FAECP e o omeprazol diminuíram a formação de LOOH para $46,9 \pm 4,6$ e $39,9 \pm 7,5$ mmol/mg de tecido, respectivamente. No entanto, a FAECV não alterou o conteúdo de LOOH de forma significativa, quando comparada com o controle (C: $65,0 \pm 3,7$ mmol/mg de tecido) (Fig. 26B).

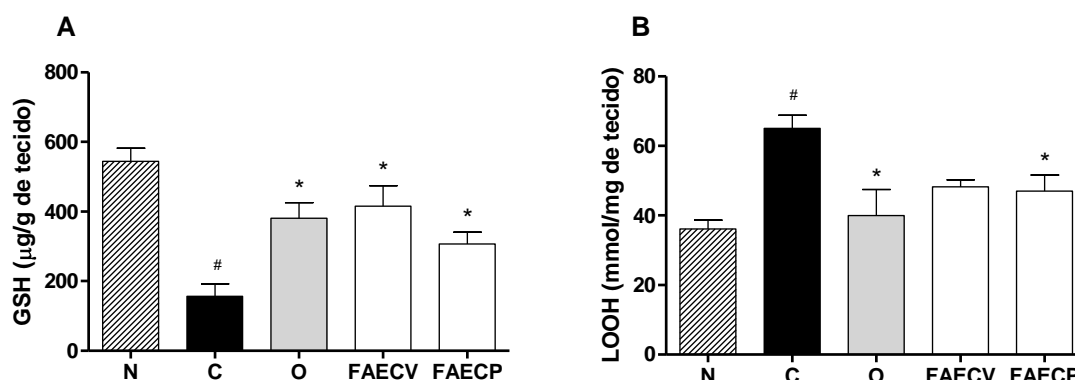


FIGURA 26 - EFEITO DA FAECV E DA FAECP NOS NÍVEIS DE GSH (PAINEL A) E DE LOOH (PAINEL B) APÓS INDUÇÃO DE ÚLCERA CRÔNICA COM ÁCIDO ACÉTICO 80% EM RATAS. Os animais foram tratados pela via oral com veículo (C: água – 0,1 mL/100g), omeprazol (O: 20 mg/kg), FAECV (1,8 mg/kg, v.o.) ou FAECP (6 mg/kg, v.o.) duas vezes ao dia durante sete dias a partir do segundo dia após a indução da úlcera. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão das médias (n=6). A comparação estatística foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. # $P < 0,05$ quando comparado ao grupo não lesionado (N: Naive). * $P < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

4.17 EFEITO DO EHCV E DO EHCP SOBRE OS NÍVEIS DE SOD E GST APÓS A INDUÇÃO DE ÚLCERA GÁSTRICA CRÔNICA POR ÁCIDO ACÉTICO

Na úlcera induzida por ácido acético, a atividade das enzimas SOD e GST foi reduzida em 38% e 45%, respectivamente, quando comparadas com o grupo não ulcerado (Naive: $13,3 \pm 0,5$ U/mg de proteína e $316,8 \pm 22,5$ $\mu\text{moles/mg}$ de proteína/min). No entanto, a administração oral de EHCV (10 mg/kg) e EHCP (30 mg/kg) restabeleceu a atividade da SOD para $13,3 \pm 0,4$ e $11,8 \pm 0,7$ U/mg de proteína, respectivamente (Fig. 27A). Em relação à GST, o EHCV e o EHCP não foram capazes de restaurar a atividade desta enzima (Fig. 27B). O omeprazol (20 mg/kg, v.o.), por sua vez, alterou a atividade da SOD e da GST para $11,9 \pm 0,2$ U/mg de proteína e $272,1 \pm 29,4$ $\mu\text{moles/mg}$ de proteína/min, respectivamente (Fig. 27A e B).

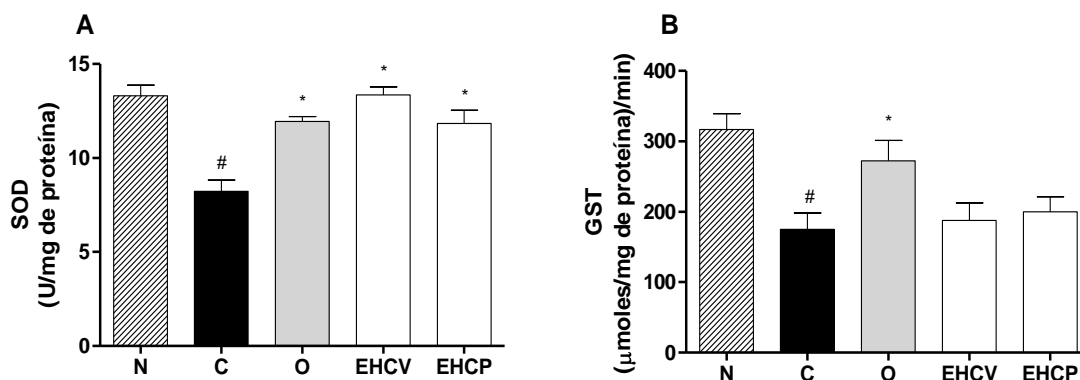


FIGURA 27 - EFEITO DO EHCV E DO EHCP NOS NÍVEIS DE SOD (PAINEL A) E DE GST (PAINEL B) APÓS INDUÇÃO DE ÚLCERA CRÔNICA COM ÁCIDO ACÉTICO 80% EM RATAS. Os animais foram tratados pela via oral com veículo (C: água – 0,1 mL/100g), omeprazol (O: 20 mg/kg), EHCV (10 mg/kg) ou EHCP (30mg/kg) duas vezes ao dia durante sete dias a partir do segundo dia após a indução da úlcera. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão das medias (n=6). A comparação estatística foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. # $P < 0,05$ quando comparado ao grupo não lesionado (N: Naive). * $P < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

4.18 EFEITO DAS FRAÇÕES FAECV E FAECP SOBRE OS NÍVEIS DE SOD E GST APÓS A INDUÇÃO DE ÚLCERA GÁSTRICA CRÔNICA POR ÁCIDO ACÉTICO

O tratamento com FAECV (1,8 mg/kg, v.o.) restaurou a atividade da SOD para $15,4 \pm 1,5$ U/mg de proteína. Porém, a mesma fração do EHCP (FAECP 6 mg/kg) não alterou a atividade desta enzima de forma significativa, quando comparada ao controle (C: $9,4 \pm 0,9$ U/mg de proteína) (Fig. 28A). A administração das frações de ambos os chás (FAECV 1,8 mg/kg e FAECP 6 mg/kg) não foi capaz de interferir na atividade da GST, quando comparadas ao controle (C: $202,9 \pm 25,5$ μmoles/mg de proteína/min) (Fig. 28B). O omeprazol, quando utilizado como controle positivo neste experimento, foi capaz de restaurar a atividade da SOD e da GST para $15,9 \pm 1,3$ U/mg de proteína e $312,7 \pm 32,5$ μmoles/mg de proteína/min, respectivamente (Fig. 28A e B).

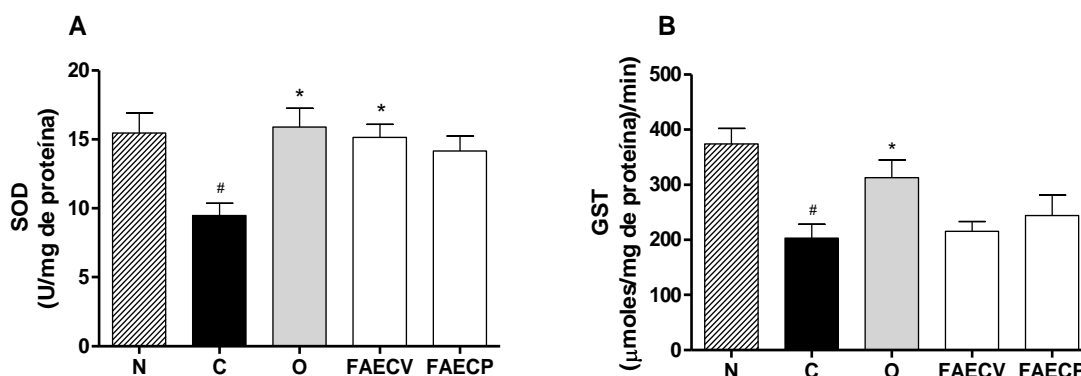


FIGURA 28 - EFEITO DA FAECV E DA FAECP NOS NÍVEIS DE SOD (PAINEL A) E DE GST (PAINEL B) APÓS INDUÇÃO DE ÚLCERA CRÔNICA COM ÁCIDO ACÉTICO 80% EM RATAS. Os animais foram tratados pela via oral com veículo (C: água – 0,1 mL/100g), omeprazol (O: 20 mg/kg), FAECV (1,8 mg/kg, v.o.) ou FAECP (6 mg/kg, v.o.) duas vezes ao dia durante sete dias a partir do segundo dia após a indução da úlcera. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão das medias (n=6). A comparação estatística foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. # $P < 0,05$ quando comparado ao grupo não lesionado (N: Naive). * $P < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

4.19 EFEITO DO EHCV E DO EHCP SOBRE OS NÍVEIS DA MPO E NAG APÓS A INDUÇÃO DE ÚLCERA GÁSTRICA CRÔNICA POR ÁCIDO ACÉTICO

Os níveis da MPO aumentaram cerca de 20 x no grupo controle quando comparado ao grupo não ulcerado (Naive: $0,705 \pm 0,1$ mD.O./mg de proteína). Quanto à NAG, houve aumento de 63% em seus níveis no grupo controle quando comparado ao grupo não lesionado (Naive: $11,5 \pm 1,3$ mD.O./mg de proteína). O tratamento oral dos animais com EHCV (10 mg/kg) e EHCP (30 mg/kg) reduziu significativamente os níveis da MPO em 77% e 70%, respectivamente, quando comparado ao controle (C: $16,0 \pm 1,5$ mD.O./mg de proteína) (Fig. 29A). No entanto, não foram observadas diferenças significativas em relação à NAG após o tratamento com os extratos, quando comparados ao grupo controle (C: $18,7 \pm 1,3$ mD.O./mg de proteína) (Fig. 29B). Já o omeprazol (20 mg/kg, v.o.) foi capaz de diminuir a atividade da MPO e da NAG em 75% e 36%, respectivamente (Fig. 29A e B).

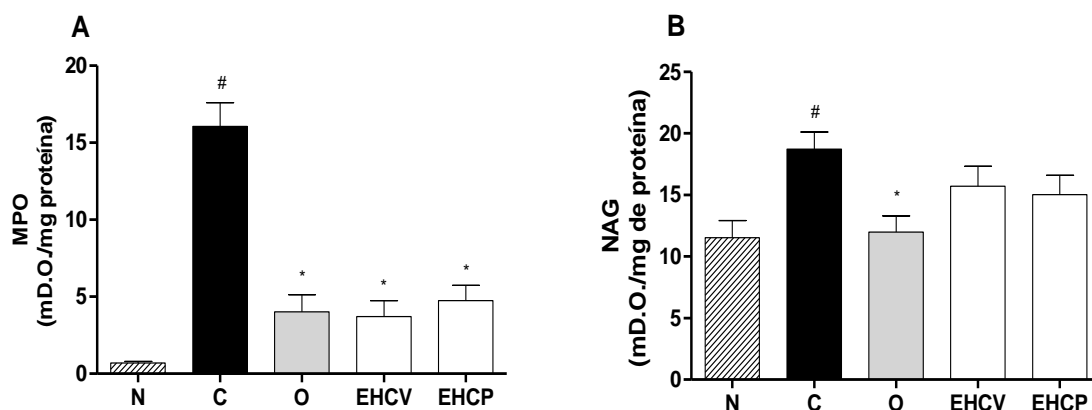


FIGURA 29 - EFEITO DO EHCV E DO EHCP NOS NÍVEIS DA MPO (PAINEL A) E DA NAG (PAINEL B) APÓS INDUÇÃO DE ÚLCERA CRÔNICA COM ÁCIDO ACÉTICO 80% EM RATAS. Os animais foram tratados pela via oral com veículo (C: água – 0,1 mL/100g), omeprazol (O: 20 mg/kg), EHCV (10 mg/kg) ou EHCP (30mg/kg) duas vezes ao dia durante sete dias a partir do segundo dia após a indução da úlcera. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão das médias (n=8). A comparação estatística foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. # $P < 0,05$ quando comparado ao grupo não lesionado (N: Naive). * $P < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

4.20 EFEITO DAS FRAÇÕES FAECV E FAECP SOBRE OS NÍVEIS DE MPO E NAG APÓS A INDUÇÃO DE ÚLCERA GÁSTRICA CRÔNICA POR ÁCIDO ACÉTICO

De maneira similar, o tratamento com FAECV (1,8 mg/kg, v.o.) e com FAECP (6 mg/kg, v.o.) também diminuiu a atividade da MPO em 48% e 42%, respectivamente, quando comparadas ao controle, neste experimento (C: $14,7 \pm 1,4$ mD.O./mg de proteína) (Fig. 30A). Contudo, não foram observadas diferenças significativas em relação aos níveis da NAG após o tratamento com as frações (Fig. 30B). O omeprazol, neste experimento, foi capaz de diminuir os níveis da MPO e da NAG em 84% e 67%, respectivamente (Fig. 30A e B).

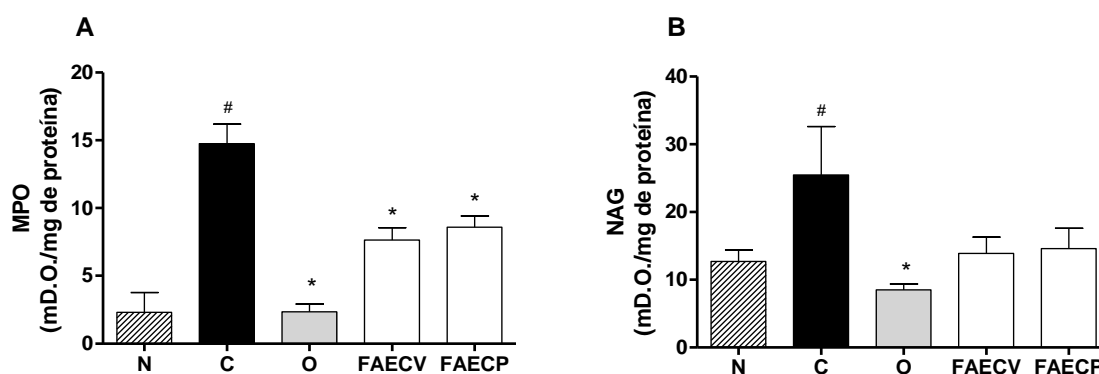


FIGURA 30 - EFEITO DA FAECV E DA FAECP NOS NÍVEIS DA MPO (PAINEL A) E DA NAG (PAINEL B) APÓS INDUÇÃO DE ÚLCERA CRÔNICA COM ÁCIDO ACÉTICO 80% EM RATAS. Os animais foram tratados pela via oral com veículo (C: água – 0,1 mL/100g), omeprazol (O: 20 mg/kg), FAECV (1,8 mg/kg, v.o.) ou FAECP (6 mg/kg, v.o.) duas vezes ao dia durante sete dias a partir do segundo dia após a indução da úlcera. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão das médias (n=8). A comparação estatística foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. # $P < 0,05$ quando comparado ao grupo não lesionado (N: Naive). * $P < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

4.21 EFEITO DO EHCV E DO EHCP SOBRE A MOTILIDADE GASTROINTESTINAL

Nos animais que receberam apenas veículo (água 0,1 mL/100g) a porcentagem de esvaziamento gástrico foi de $69,6 \pm 4,1\%$. O EHCV nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg e o EHCP nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg administrados por via oral, não alteraram significativamente a taxa de esvaziamento gástrico quando comparados ao controle. Entretanto, o tratamento com domperidona (20 mg/kg, v.o.) e atropina (3 mg/kg, s.c.) alterou a taxa de esvaziamento gástrico para $86,7 \pm 4,8\%$ e $53,8 \pm 4,3\%$, respectivamente (Fig. 31A e B).

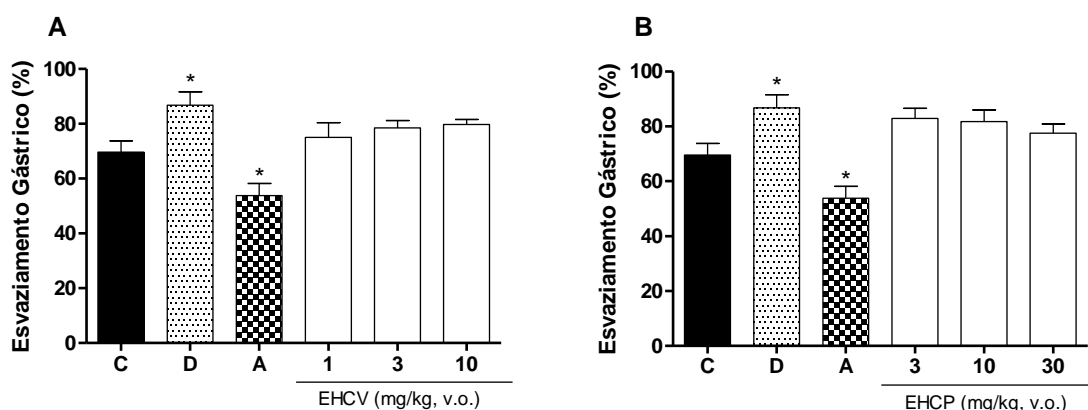


FIGURA 31 - EFEITO DO EHCV (PAINEL A) E EHCP (PAINEL B) SOBRE O ESVAZIAMENTO GÁSTRICO EM CAMUNDONGOS. Os animais foram tratados pela via oral com veículo (C: água – 0,1 mL/100g), domperidona (D: 20 mg/kg), atropina (A: 3 mg/kg, s.c.), EHCV (1, 3 e 10 mg/kg) e EHCP (3, 10 e 30mg/kg). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão das médias (n = 6). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. * $P < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

No entanto, o EHCV (10 mg/kg e 30 mg/kg) e o EHCP (3, 10 e 30 mg/kg) foram capazes de aumentar significativamente o trânsito intestinal para $64,3 \pm 4,1\%$; $66,9 \pm 3,2\%$; $64,0 \pm 2,7\%$; $64,7 \pm 5,7\%$ e $68,0 \pm 3,8\%$, respectivamente, quando comparados com o grupo controle ($47,6 \pm 3,1\%$) (Fig. 32A e B). O grupo de animais tratado com neostigmina (20 μ g/kg, s.c.) também apresentou um aumento no trânsito intestinal para $68,3 \pm 4,1\%$. Já os animais que receberam atropina (3 mg/kg, s.c.) apresentaram uma redução do trânsito intestinal para $28,2 \pm 1,8\%$ (Fig. 32A e B).

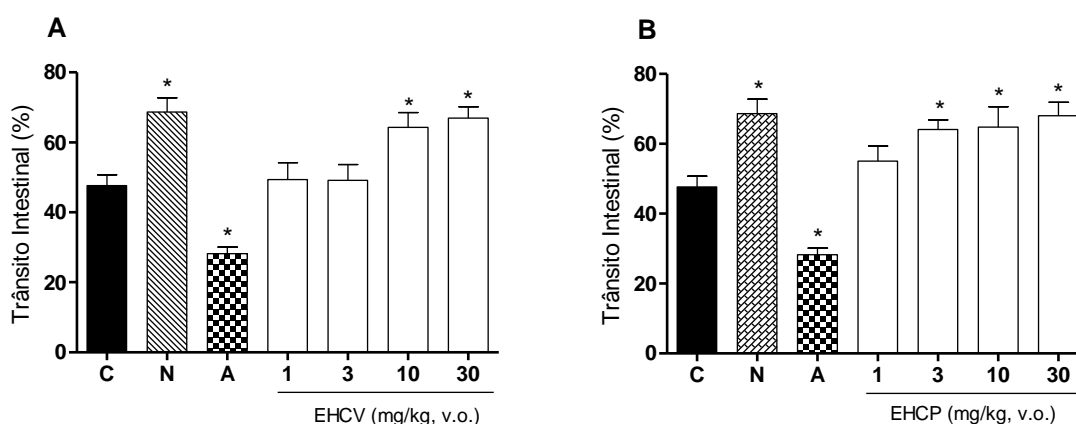


FIGURA 32 - EFEITO DO EHCV (PAINEL A) E EHCP (PAINEL B) SOBRE O TRÂNSITO INTESTINAL EM CAMUNDONGOS. Os animais foram tratados pela via oral com veículo (C: água – 0,1 mL/kg), neostigmina (N: 20 μ g/kg, s.c.), atropina (A: 3 mg/kg, s.c.), EHCV (1, 3, 10 e 30 mg/kg) e EHCP (1, 3, 10 e 30 mg/kg). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão das médias (n = 10). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. * $P < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

4.22 EFEITO DO TRATAMENTO POR SETE DIAS COM EHCV, EHCP, FAECV E FAECP SOBRE PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS

O tratamento dos animais com EHCV (10 mg/kg, v.o.) ou EHCP (30 mg/kg, v.o.) (Fig. 33A), assim como com suas frações, (FAECV 1,8 mg/kg, v.o.) ou (FAECP 6 mg/kg, v.o.) (Fig. 33B), duas vezes ao dia durante sete dias, não alterou significativamente o peso corporal dos animais, quando comparado ao grupo controle. Da mesma forma, o peso relativo dos órgãos selecionados (Tabela 4) e os parâmetros bioquímicos analisados (Tabela 5) não foram alterados com os tratamentos citados quando comparados com o controle.

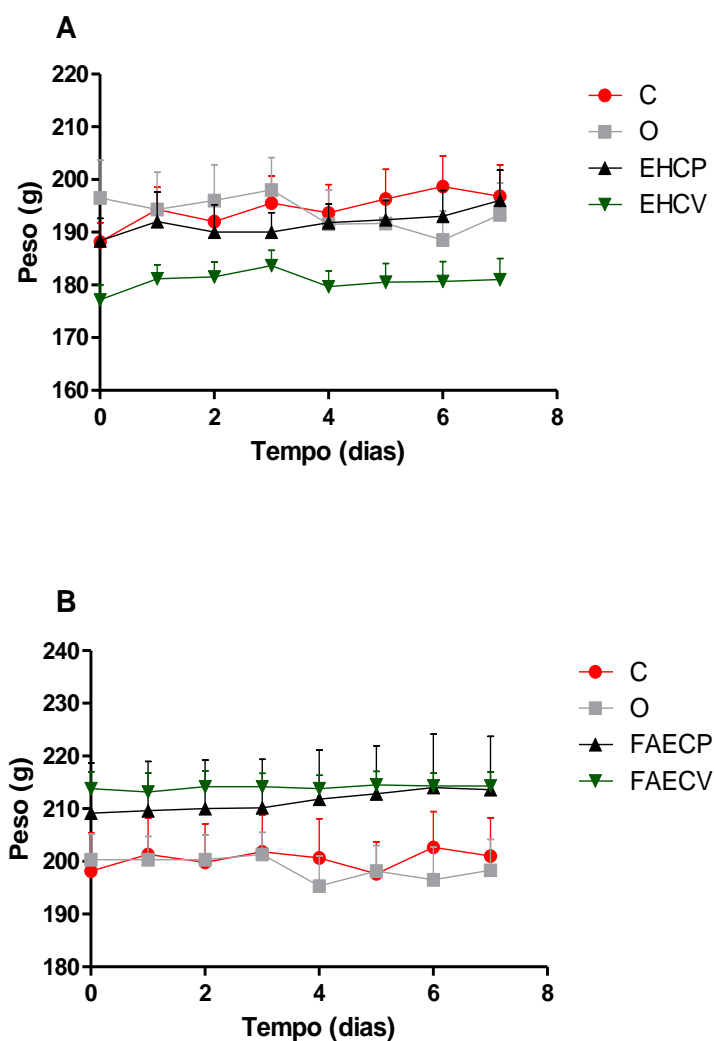


FIGURA 33 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DO EHCV OU EHCP (PAINEL A) OU DA FAECV OU FAECP (PAINEL B) NO PESO CORPORAL DOS ANIMAIS NA ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO 80% EM RATAS APÓS SETE DIAS DE TRATAMENTO. Os animais foram tratados pela via oral com veículo (C: água – 0,1 mL/100g), omeprazol (O: 20 mg/kg), EHCV (10 mg/kg), EHCP (30mg/kg), FAECV (1,8 mg/kg, v.o.) ou FAECP (6 mg/kg, v.o.) duas vezes ao dia durante sete dias a partir do segundo dia após a indução da úlcera. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão das médias (n = 6). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo teste de Bonferroni.

TABELA 4 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DO EHCV, EHCP, FAECV E FAECP NO PESO RELATIVO DOS ÓRGÃOS NA ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO 80% EM RATAS APÓS SETE DIAS DE TRATAMENTO

Tratamento/ Peso dos órgãos (%)	Controle	Omeprazol	EHCV	EHCP	FAECV	FAECP
Adrenal esquerda	0,018 ± 0,002	0,015 ± 0,002	0,020 ± 0,001	0,023 ± 0,001	0,024 ± 0,001	0,021 ± 0,001
Adrenal direita	0,015 ± 0,002	0,017 ± 0,002	0,021 ± 0,001	0,022 ± 0,0005	0,025 ± 0,002	0,020 ± 0,002
Baço	0,397 ± 0,029	0,395 ± 0,022	0,399 ± 0,026	0,385 ± 0,007	0,337 ± 0,016	0,322 ± 0,022
Coração	0,382 ± 0,011	0,419 ± 0,028	0,409 ± 0,011	0,392 ± 0,019	0,313 ± 0,008	0,358 ± 0,023
Fígado	2,966 ± 0,052	2,834 ± 0,086	2,953 ± 0,046	2,968 ± 0,114	2,851 ± 0,208	2,916 ± 0,264
Ovário esquerdo	0,035 ± 0,003	0,030 ± 0,002	0,033 ± 0,004	0,041 ± 0,002	0,032 ± 0,001	0,035 ± 0,004
Ovário direito	0,034 ± 0,004	0,028 ± 0,001	0,033 ± 0,004	0,039 ± 0,003	0,028 ± 0,002	0,034 ± 0,004
Pulmões	0,734 ± 0,038	0,690 ± 0,043	0,765 ± 0,040	0,845 ± 0,092	0,531 ± 0,062	0,658 ± 0,042
Rim esquerdo	0,364 ± 0,010	0,354 ± 0,015	0,395 ± 0,015	0,368 ± 0,010	0,345 ± 0,016	0,358 ± 0,016
Rim direito	0,347 ± 0,013	0,354 ± 0,011	0,362 ± 0,015	0,363 ± 0,015	0,339 ± 0,013	0,380 ± 0,017
Útero	0,169 ± 0,030	0,143 ± 0,009	0,160 ± 0,019	0,173 ± 0,026	0,195 ± 0,022	0,242 ± 0,049

Os resultados estão expressos como média ± erro padrão das médias (n = 6). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni.

TABELA 5 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DO EHCV, EHCP, FAECV E FAECP NOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS: ALT, AST, CREATININA E UREIA NA ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO 80% EM RATAS APÓS SETE DIAS DE TRATAMENTO

Tratamento/ Parâmetros Bioquímicos	ALT (U/L)	AST (U/L)	Creatinina (mg/dL)	Ureia (mg/dL)
Naive	50,3 ± 10,3	84,8 ± 7,1	0,525 ± 0,071	12,3 ± 0,2
Controle (0,1ml/100g)	37,8 ± 8,5	88,3 ± 13,0	0,492 ± 0,070	11,5 ± 0,8
Omeprazol (20 mg/kg)	42,6 ± 13,0	86,6 ± 11,7	0,510 ± 0,047	10,5 ± 1,9
EHCV (10 mg/kg)	46,5 ± 9,3	75,6 ± 17,1	0,541 ± 0,039	11,8 ± 1,3
EHCP (30 mg/kg)	43,9 ± 7,4	91,1 ± 7,4	0,518 ± 0,038	11,1 ± 0,8
FAECV (1,8 mg/kg)	47,1 ± 11,0	92,8 ± 8,7	0,536 ± 0,054	10,2 ± 0,4
FAECP (6 mg/kg)	39,2 ± 8,6	91,4 ± 25,5	0,500 ± 0,053	14,3 ± 0,7

Os resultados estão expressos como média ± erro padrão das médias (n = 6). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni.

5 DISCUSSÃO

No início do século XX, a úlcera péptica era a doença gastrointestinal mais comum entre a população (DAVIDE, 2009). Entretanto, o conhecimento da sua fisiopatologia fez com que a evolução na abordagem farmacoterapêutica desta patologia tenha sido notória, provocando seu declínio. Atualmente, mesmo com o estabelecimento de estratégias terapêuticas eficazes fundamentadas no uso de fármacos antissecretores como o omeprazol e a cimetidina, a úlcera péptica afeta cerca de 4 milhões de pessoas por ano, em todo o mundo (THORSEN *et al.*, 2013). Além disso, estudos apontam que a supressão ácida pode não ser suficiente para um processo cicatricial completo, fazendo com que a úlcera possa reaparecer, após sua cicatrização, ao longo da vida do paciente (KANGWAN *et al.*, 2014), tornando necessário o tratamento prolongado de fármacos antissecretores (TANG e CHAN, 2012). Neste contexto, os efeitos colaterais decorrentes da supressão ácida gástrica crônica tem sido alvo de preocupações e questionamentos sobre o uso, em longo prazo, dos tratamentos clássicos (IBP e antagonistas H_2) (GARCIA-RODRIGUEZ e RUIGOMEZ, 2007), e os produtos extraídos de plantas medicinais são promissores para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas mais seguras e eficazes.

As plantas medicinais foram os primeiros recursos terapêuticos utilizados para o cuidado da saúde dos seres humanos, sendo, portanto, uma cultura milenar que acompanha a evolução humana (ALMEIDA, 1993). Produto natural é um composto químico produzido por qualquer organismo vivo encontrado na natureza e, quando apresenta algum tipo de atividade farmacológica, pode ser diretamente utilizado como medicamento, ou então, como modelo para o desenvolvimento de novas drogas. Assim, dentre os produtos naturais utilizados, os chás da *Camellia sinensis* merecem destaque. Durante séculos, estes chás têm sido considerados pelos orientais uma bebida saudável, sendo utilizado na China há aproximadamente 3.000 anos (SENGER *et al.*, 2010). Atualmente seu consumo estendeu-se também para o restante do mundo, principalmente pela comprovação de inúmeras propriedades de promoção da saúde através de estudos científicos. Além disso, é bem conhecido que as condições de processamento, crescimento ou colheita da *Camellia sinensis* podem alterar os componentes químicos dos diferentes chás. Sendo assim, neste estudo avaliamos o efeito gastroprotetor e cicatrizante gástrico de duas categorias do processo de fabricação: não oxidado (chá verde) e oxidado (chá preto).

Como já mencionado, os chás tem um alto consumo mundial, principalmente em decorrência de seu sabor agradável e refrescante e pelos benefícios para saúde bem conhecidos na medicina tradicional, como a melhora da digestão (SHARANGI, 2009). Algumas pesquisas já comprovaram a atividade gastroprotetora (ADHIKARY *et al.*, 2011a ADHIKARY *et al.*, 2011b; HAMAISHI *et al.*, 2006; MAITY *et al.*, 1995) e anti *H. pylori* (LEE *et al.*, 2004; ANKOLEKAR *et al.*, 2011), de extratos e componentes da *Camellia sinensis*, e, por esta razão, neste trabalho nós aprofundamos os estudos deste efeito através do fracionamento biomonitorado e da avaliação dos extratos na úlcera crônica.

Um estudo anterior, realizado por nosso grupo, apontou o potencial gastroprotetor dos extratos hidroalcoólicos de chá verde (EHCV), chá preto (EHCP) e de suas frações administrados oralmente, no modelo de lesões gástricas agudas induzidas por etanol (SCOPARO *et al.*, 2014). Este agente necrosante penetra rapidamente na mucosa gástrica, e por uma ação físico-química, consegue romper a barreira de muco e bicarbonato, reduz a disponibilidade de grupos sulfidrílicos não-proteicos, e induz a uma série de alterações na microcirculação promovendo danos à mucosa gástrica (SZABO *et al.*, 1985; KALIA *et al.*, 2000). Apesar de o etanol causar lesões superficiais que não representam integralmente a patologia humana, é um teste muito utilizado para triar moléculas com possível atividade antiúlcera. Porém, vale ressaltar, que neste modelo de indução de lesões gástricas, a atividade gastroprotetora pode ser devido a uma ação mecânica, com formação de uma barreira pelo extrato ou fração, impedindo que o etanol agreda a mucosa (TWARDOWSCHY, 2007). Interessantemente, a redução das lesões também ocorreu quando, neste estudo, os extratos foram administrados pela via intraperitoneal partindo de uma dose 3 vezes menor que a DE₅₀ que promoveu gastroproteção contra o etanol pela via oral (SCOPARO *et al.*, 2014), indicando que o efeito gastroprotetor não ocorre unicamente através da formação de uma barreira física, e parece estar associado ao aumento dos níveis de muco e de GSH.

Com base nestes resultados, nós utilizamos o EHCV e EHCP nas DE₅₀ obtidas na gastroproteção contra o etanol (3,6 mg/kg e 10,2 mg/kg, respectivamente) (SCOPARO *et al.*, 2014), em outro modelo de lesão gástrica aguda, a induzida por indometacina. Os AINEs, ampla classe terapêutica que inclui a indometacina, exercem seus efeitos terapêuticos principalmente pela diminuição dos níveis circulantes da PGE₂, através da inibição das isoenzimas COX, uma vez que estas substâncias estão envolvidas na patogênese da dor e febre na inflamação (ROBBINS *et al.*, 2013). Entretanto, esta redução dos níveis de PGs ocasionada pelos AINEs, é nociva para a mucosa gástrica, podendo provocar ulcerações e também exacerbar lesões gástricas pré-existent em roedores e humanos (JONES *et al.*,

1999; HALTER *et al.*, 2001), tendo em vista o papel protetor destas substâncias. Os prostanóides derivados da COX-1 são responsáveis por estimular a secreção de muco e bicarbonato bem como o fluxo sanguíneo da mucosa gástrica, além de induzir a angiogênese (WALLACE, 2008), enquanto que os da COX-2 têm o papel de influenciar a proliferação epitelial e a aderência endotelial de leucócitos (WALLACE e DEVCHAND, 2005), fatores estes que contribuem para a cicatrização da úlcera. Vale ressaltar, que além da inibição da síntese de PGs, a geração de EROs, a infiltração de neutrófilos, o desequilíbrio de citocinas e a própria ação local de AINEs, também estão envolvidos no processo de formação da úlcera (PERINI *et al.*, 2004).

Nossos resultados demonstraram que ambos os extratos também apresentaram efeito protetor da mucosa gástrica contra lesões induzidas pela indometacina. Histologicamente constatamos uma descamação do epitélio gástrico provocada pelo antiinflamatório, efeito este já esperado, uma vez que é característico a estes fármacos, a degradação dos fosfolipídios presentes tanto no muco aderido quanto nas membranas celulares do epitélio gástrico, reduzindo assim, sua hidrofobicidade, o que favorece a retrodifusão de íons hidrogênio e aumenta a suscetibilidade do epitélio a ação do ácido gástrico e pepsina (BERSTAD *et al.*, 2002). De forma interessante, microscopicamente também é possível observar que o tratamento com os extratos foi capaz de manter a organização e integridade da túnica mucosa após a exposição à indometacina. Nossos resultados estão de acordo com os trabalhos de Adhikary *et al.* (2011a e 2011b), que demonstraram a gastroproteção contra lesões induzidas por indometacina desempenhadas pelo extrato aquoso de chá preto e teaflavinas presentes nele, e pela epigallocatequina-3-O-galato, a principal catequina encontrada no chá verde.

A propósito, as frações obtidas pelo particionamento dos extratos EHCV e EHCP através da extração sucessiva com solventes de diferentes polaridades, também foram testadas no modelo de úlcera induzida pelo antiinflamatório indometacina, sendo suas doses baseadas nas do estudo de Scoparo *et al.* (2014), que já demonstrou gastroproteção contra o etanol. Interessantemente, somente as frações butanólica e acetato de etila de ambos extratos (FBuCV, FAECV, FBuCP e FAECP), reduziram a área da lesão promovida pela indometacina, sendo que a análise histológica também confirma o menor dano epitelial em animais tratados com as frações citadas.

Os perfis químicos das frações de EHCV e EHCP particionadas com o mesmo solvente são muito semelhantes, diferindo apenas em algumas classes de compostos químicos e nas suas quantidades, devido à oxidação a que as folhas são submetidas durante o processamento (SCOPARO *et al.*, 2012). Estas diferenças, que incluem a variação no teor de

polifenóis (30 a 40% no chá verde e 3 a 10% no chá preto) (SHARANGI, 2009), a presença de produtos da oxidação das catequinas, como as teaflavinas e teasinensinas, a ausência das saponinas, bem como a ausência e/ou diminuição da EGCG, observadas para o chá preto, poderiam contribuir para a menor potência do EHCP observada no modelo de lesões por indometacina. Esta menor potência do EHCP também se apresentou no modelo de lesão por etanol (SCOPARO *et al.*, 2014). Quanto às frações, que apresentaram atividade gastroprotetora, concentram o maior conteúdo de compostos fenólicos como flavonóides e catequinas (SCOPARO *et al.*, 2012), o que corrobora os resultados de Adhikary *et al.* (2011a e 2011b) citados acima, que observaram o mesmo efeito com compostos pertencentes a esta classe.

Observou-se também que a EGCG é o principal composto (34%) (SCOPARO *et al.*, 2012) da fração acetato de etila do chá verde (FAECV), que se mostrou a mais efetiva das frações de ambos os extratos contra a indometacina, neste estudo, a qual também apresentou atividade gastroprotetora no modelo de úlcera induzida por etanol (SCOPARO *et al.*, 2014). Considerando este dado, nós verificamos se esta substância isolada, em dose calculada com base na DE₅₀ teórica da fração (FAECV) em relação ao seu rendimento, poderia ser a responsável pela gastroproteção promovida pela sua fração, no modelo de úlcera induzida por indometacina. Nossos experimentos mostraram macroscopicamente e microscopicamente, que a EGCG foi capaz de evitar o efeito nocivo da indometacina na mucosa gástrica. Estes dados estão de acordo com o estudo de Adhikary *et al.* (2011a), que também demonstrou esta atividade. Sendo assim, é possível que a EGCG esteja envolvida na gastroproteção do chá verde.

Com a confirmação do efeito gastroprotetor dos extratos hidroalcoólicos dos chás da *Camellia sinensis* e a identificação de frações e de um composto isolado ativo, nós prosseguimos os estudos investigando se os mecanismos de proteção da mucosa gástrica estariam envolvidos no efeito destas substâncias.

A barreira de muco gástrico constitui a primeira linha de defesa da mucosa contra a secreção de ácido, devido à formação de um gel viscoso, elástico e aderente (LAINE *et al.*, 2008), sendo a manutenção dos seus níveis especialmente importante na prevenção de lesões causadas por antiinflamatórios. Embora, mais recentemente, evidências tenham consolidado a importância da COX-2 durante a cicatrização gástrica, é a inibição da COX-1, e consequentemente da produção de prostaglandinas e muco, o principal fator para o desequilíbrio dos agentes protetores da mucosa, que na presença do agressor (indometacina), leva à formação das lesões (FORNAI *et al.*, 2005; WALLACE, 2008). Assim, compostos que

aumentam a síntese e secreção de muco gástrico, ou que promovam a síntese de PGs, podem atuar como potentes citoprotetores gástricos. Os resultados obtidos mostraram que ambos os extratos (EHCV e EHCP) e as frações FAECV, FAECP e FBUCP deles, foram capazes de restaurar os níveis de muco gástrico aderido. Interessantemente, apesar da fração acetato de etila do chá verde (FAECV) apresentar alteração nos níveis de muco na úlcera induzida por indometacina, a EGCG não foi capaz de restaurá-los aos níveis basais. Porém, Adhikary *et al.* (2011a) observaram um aumento no conteúdo de muco em animais tratados com a EGCG (2 mg/kg), dose cerca de 1000 x maior que a utilizada em nosso estudo.

Alanko *et al.* (1999) sugerem que os fenóis, grupo químico presente em ambos extratos e nas frações, estimulam a formação de PGE₂, que, por sua vez, está relacionada a vários mecanismos de proteção do trato gastrointestinal, dentre os quais se destaca a produção do muco, através da ação em receptores EP4. Além da quantidade, a consistência e elasticidade da camada mucosa, também são indispensáveis para a gastroproteção, e podem ser mantidas através da ação do GSH, capaz de evitar a quebra das pontes de dissulfeto das macromoléculas mucoproteicas (AVILA *et al.*, 1996).

Compostos sulfidrilas são potentes sequestradores de radicais livres, e além de auxiliar na manutenção da integridade do muco, também são responsáveis pela integridade gástrica ao contribuir na reciclagem de vitaminas antioxidantes e impedir a peroxidação lipídica (AVILA *et al.*, 1996; GRANT, 2001). A lesão gástrica ocasionada pelos AINEs está bastante associada a danos oxidativos como lipoperoxidação e esgotamento do sistema antioxidante (BERTRAND *et al.*, 1999), evidentes na diminuição dos níveis de GSH no tecido gástrico dos animais lesionados pela indometacina observada em nosso estudo. O EHCP e sua fração butanólica (FBUCP) foram capazes de evitar a depleção de GSH pela indometacina. Sabe-se que, o chá preto, assim como os outros chás da *Camellia sinensis*, são ricos em polifenóis, tais como flavonóides (SCOPARO *et al.*, 2012), cujo efeito antioxidante já foi comprovado cientificamente através de vários estudos (BORELLI e IZZO, 2000; COOPER *et al.*, 2005; MATSUZAKI e HARA, 1985; TANIZAWA *et al.*, 1984; THAWONSUWAN *et al.*, 2010; IM *et al.*, 2013). Sendo assim, a propriedade antioxidante de compostos presentes na *Camellia sinensis* parece ser importante para o seu efeito gastroprotetor, visto que a geração de EROs é crucial no desenvolvimento de úlceras ocasionadas pelo etanol, uso de AINEs, entre outros agentes (BANDYOPADHYAY *et al.*, 2001).

Em conjunto, os resultados discutidos até este ponto indicam que a ação dos extratos, frações e da EGCG na diminuição de lesões gástricas induzidas por indometacina, parecem estar associada, em parte, ao efeito antioxidante de seus constituintes químicos, uma vez que

eles podem atuar de forma direta sobre as EROs, diminuindo a intensa geração de radicais livres produzidas durante a lesão (SULEYMAN *et al.*, 2009), mantendo a integridade do muco produzido, ou ainda, facilitando a produção de PGs (ALANKO *et al.*, 1999). Corroborando com esta hipótese, apenas as frações que concentram os compostos fenólicos, potentes antioxidantes, protegeram a mucosa contra as lesões causadas pelo antiinflamatório. Além disso, Adhikary *et al.* (2011c) observou que em animais tratados com a EGCG e submetidos à ação ulcerogênica da indometacina, os níveis de expressão de COX-1 e COX-2, assim como o conteúdo de PGs, estavam aumentados. Assim, ainda que haja inibição de moléculas de COX decorrente da ação do AINE, o aumento da expressão desta enzima promovido pela EGCG mantém os níveis de PGs e favorece os mecanismos de defesa da mucosa gástrica. Neste sentido, é possível que os compostos da *Camellia sinensis* estudados neste trabalho também exerçam seus efeitos de maneira similar. Tal hipótese é favorecida pelo aumento dos níveis de muco aderido a mucosa, que é produzido pelas PGs (WALLACE, 2008), nos animais tratados com EHCV, EHCP e algumas de suas frações, apesar da ação da indometacina. Adicionalmente, as PGs também estão envolvidas no estímulo de tensoativos hidrofóbicos tais como secreção de fosfolípidos nas células epiteliais gástricas (ALY, 1987), o que pode ter minimizado o dano tecidual demonstrado pela análise histológica em animais tratados com os compostos testes.

Continuando com a avaliação dos prováveis mecanismos de ação dos extratos, nós avaliamos a capacidade do EHCV e EHCP em diminuir parâmetros agressores da mucosa gástrica. A secreção ácida é o principal fator agressor endógeno que, somada à ação da pepsina, enzima proteolítica ativada em meio ácido pela conversão do pesinogênio, pode contribuir para o aparecimento e agravamento das lesões gástricas (MAITY *et al.*, 2003; RAUFMAN, 1996). Logo, os medicamentos mais utilizados para o tratamento de úlceras são os fármacos anti-secretores (GILL *et al.*, 2011). Os dados obtidos neste estudo confirmaram a atividade antisecretora e de inibição da pepsina do omeprazol, um clássico inibidor da bomba de prótons e revelaram que EHCV e EHCP não interferem em parâmetros do conteúdo gástrico, como o volume a acidez, nem na atividade da pepsina, mesmo em diferentes vias de administração. No entanto, um estudo realizado por Banerjee *et al.* (2010) demonstra que, uma extração aquosa de chá preto foi capaz de reduzir significativamente a acidez do suco gástrico, embora a única via testada tenha sido a intraduodenal. Outro estudo de Rozza *et al.* (2012) também revela a ação anti-secretora da epicatequina, uma catequina presente no chá verde, que também foi capaz de diminuir a concentração de íons H^+ no suco gástrico.

De acordo com Tarnawski *et al.* (2013) os mecanismos de proteção podem ser distintos e separados da inibição gástrica, e é assim que os extratos parecem atuar, por meio do fortalecimento de agentes protetores da mucosa gástrica, embora não exerçam atividade antissecretora ou inibição da atividade péptica. Compostos com esta ação são uma oportunidade para o desenvolvimento de medicamentos anti-ulcerosos melhorados, cuja probabilidade de efeitos adversos decorrentes da hipergastrinemia causada pela acloridria intensa, é muito baixa. A inibição da secreção ácida não é interessante também por diminuir a proteção do estômago contra o crescimento bacteriano excessivo e até mesmo por afetar a absorção de outros medicamentos (CENTANNI *et al.*, 2006; SCHUBERT e PEURA, 2008).

Devido aos efeitos positivos apresentados pelo EHCV e EHCP e por suas frações na proteção das lesões induzidas por indometacina, investigamos a propriedade cicatrizante gástrica dos mesmos através do modelo de úlcera crônica induzida por ácido acético. Vários estudos já demonstraram que o ácido acético, quando entra em contato com o estômago, inicia uma série de mecanismos destrutivos, com alterações nos níveis de PGs, fatores de crescimento, NO, citocinas e muco, além de aumentar a produção de EROs (KOBAYASHI *et al.*, 2001; NAKAO *et al.*, 2014). Somados, estes fatores resultam na formação da úlcera, e uma vez que esta lesão se forma, logo tem início os processos clássicos de cicatrização da ferida. Estes mecanismos envolvem a reepitelização, reparação do tecido lesionado pela formação de tecido de granulação e reconstrução da barreira de muco, que incluem a proliferação, diferenciação e migração celular, reorganização glandular e vascular, e aumento de mucina gástrica, respectivamente (TARNAWSKI e AHLUWALIA, 2012). Neste modelo, a administração oral de EHCV e EHCP foi capaz de manter importantes agentes de defesa gástrica, como a barreira de muco evidenciado pelo aumento de mucinas, e agentes antioxidantes, como o GSH e a SOD, possibilitando a regressão de parâmetros nocivos relacionados com o desenvolvimento de úlceras, como o estresse oxidativo e a inflamação da mucosa gástrica. Tais mecanismos parecem ter contribuído para o desempenho eficaz dos extratos em acelerar a cicatrização gástrica, que pode ser observado, macro e microscopicamente, através da redução da área de ulceração. Esta atividade é promissora quando se considera que o modelo de úlcera induzida por ácido acético (TAKAGI *et al.*, 1969) mimetiza muito bem as úlceras em humanos em termos de localização e fisiopatologia (OKABE *et al.*, 2012). No entanto, foi necessária uma dose 3 vezes maior do extrato de chá preto (EHCP) que do chá verde (EHCV) para atingir em torno de 50% do efeito cicatrizante. Assim, os resultados dos extratos no modelo de úlcera crônica parecem confirmar que as

diferenças na quantidade e na natureza dos compostos químicos entre os diferentes chás, ocasionada pelo processamento da planta, podem influenciar na atividade biológica.

Como já mencionado, o muco é um dos principais fatores defensores da mucosa gástrica, atuando não só na prevenção de lesões agudas, mas também durante o processo de cicatrização. De acordo com Wallace (2008), no crítico período após a lesão em que as camadas superiores são destruídas expondo o tecido de granulação ao conteúdo luminal, o muco liberado a partir de células epiteliais danificadas e o plasma exsudado dos vasos da submucosa se fundem para formar uma camada protetora sobre a região da úlcera desnuda de epitélio chamada "Tampa mucóide". O pH no interior da tampa de muco é mantido próximo a neutralidade graças a microcirculação, e essa proteção contra a acidez do lúmen gástrico é fundamental para a reepitelização do local lesionado. Sendo assim, o aumento dos níveis de mucina pelo EHCV e EHCP, mensurados pelo método histoquímico de PAS, fortalecem mais uma vez o envolvimento deste agente protetor no mecanismo de ação dos extratos.

Sabe-se que há uma estreita relação entre a inflamação e cicatrização gástrica. A ativação de leucócitos durante o processo inflamatório desencadeado na úlcera é seguida pela ativação de enzimas que promovem o aumento do consumo de oxigênio para a produção de ânion superóxido, o precursor de várias espécies reativas de oxigênio (EROs) (MATHY-HARTERT *et al.*, 1998). Hamaishi *et al.* (2006) sugerem que a geração de radicais livres pelos neutrófilos pode ser um fator determinante para a formação de úlceras crônicas induzidas pelo ácido acético, da mesma forma como é indicada nas lesões gástricas induzidas pelo etanol e indometacina. Estas moléculas são altamente instáveis e tendem a associar-se com outras estruturas, tais como os lipídios da membrana, proteínas e DNA, em busca de estabilidade (HELLOU *et al.*, 2012), podendo provocar danos celulares. Adicionalmente, a infiltração de neutrófilos induz anormalidade na microcirculação, que atrasam a cicatrização gástrica (BOU-ABBOUD *et al.*, 1988).

A atividade da mieloperoxidase, enzima presente nos neutrófilos, é considerada um bom indicador para a avaliação da infiltração destas células polimorfonucleadas no tecido (NISHIDA *et al.*, 1997; POTRICH *et al.*, 2010). No presente estudo, a administração dos EHCV e EHCP diminuiu os níveis da MPO, sugerindo a redução da infiltração de neutrófilos no mecanismo de cicatrização da úlcera. No entanto, não foi observada diferença significativa na atividade da NAG, utilizada como um indicador da presença de leucócitos mononucleares no tecido, possivelmente porque estas células são secundárias no processo inflamatório, e um tempo de tratamento mais longo que sete dias poderia ser necessário para que diferenças significativas fossem observadas.

As propriedades antioxidantes dos extratos (EHCV e EHCP) também foram confirmadas no modelo de úlcera crônica induzida por ácido acético, evidenciadas pela redução da peroxidação lipídica, pela prevenção da depleção do GSH, ou mesmo pelo aumento da atividade de agentes que removem os radicais livres cataliticamente, como a enzima SOD. Estes resultados são esperados pela presença de grupos químicos, como os compostos fenólicos, na composição dos chás da *Camellia sinensis* (SCOPARO *et al.*, 2012), cujo efeito antioxidante é conhecido há quase 30 anos (SCALBERT, 2005), lembrando que embora os resultados tenham sido parecidos, as doses dos chás escolhidas para a investigação dos mecanismos de ação foram diferentes (EHCV, 10 mg/kg) e (EHCP, 30 mg/kg).

Nós também avaliamos as frações mais potentes de cada extrato contra o etanol, FAECV e FAqCP (SCOPARO *et al.*, 2014) e contra a indometacina, FAECV e FAECP obtidos neste estudo, no modelo de úlcera crônica, a fim de identificar os prováveis compostos responsáveis pela atividade cicatrizante dos extratos. As doses foram calculadas com base na melhor dose de cada extrato no modelo de úlcera induzida por ácido acético (EHCV 10 mg/kg e EHCP 30 mg/kg), levando-se em conta o rendimento da fração.

A fração acetato de etila do chá verde (FAECV) reduziu a área da úlcera gástrica induzida pelo ácido acético, reforçando a importância das catequinas, como a epicatequina, a epicatequina galato e a epigallocatequina galato (EGCG) na atividade anti-úlcera do chá verde. Interessantemente, apenas a fração acetato de etila do chá preto (FAECP), que concentra teaflavinas, bisflavanóis e ácidos epiteaflavílicos (SCOPARO *et al.*, 2012), produtos originados da condensação das catequinas, apresentou efeito cicatrizante gástrico. Este resultado está de acordo com um estudo de Hamaishi *et al.* (2006) que evidencia a ação das catequinas na redução de úlcera gástrica induzidas por ácido acético.

Vale ressaltar ainda, que de forma geral, os mecanismos de ação das frações testadas (FAECV e FAECP) foram muito semelhantes aos apresentados pelos seus respectivos extratos brutos, com aumento de mucina, diminuição da infiltração de neutrófilos e redução do estresse oxidativo.

A EGCG, componente majoritário da FAECV (34%), também foi avaliada no modelo de úlcera induzida por ácido acético a fim de verificar se este composto seria o responsável pelo efeito observado na fração. Porém, nossos resultados demonstraram que a EGCG, na dose de 612 µg/kg, equivalente a seu rendimento na fração (FAECV), não foi capaz de regredir o tamanho da úlcera induzida pelo ácido acético. Com efeito, estudos anteriores demonstram a atividade anti-úlcera da EGCG, mas em um modelo de úlcera aguda e em doses maiores do que a utilizada neste estudo (ADHIKARY *et al.*, 2011a e 2011c). Segundo estudos

farmacocinéticos de Chen *et al.* (1997) e Lee *et al.* (2002), a biodisponibilidade das catequinas contidas no chá verde é baixa, e da EGCG especificamente, foi ainda menor quando se forneceu este composto isolado. Logo, a presença de outros componentes no extrato do chá verde parece aumentar a absorção de EGCG, e talvez isso possa explicar o efeito cicatrizante gástrico no modelo de úlcera induzida por ácido acético da fração acetato de etila do chá verde – FAECV (que concentra as catequinas) e não da EGCG isoladamente. Além disso, é possível que este composto necessite atuar combinado aos demais presentes na planta para desempenhar determinadas ações biológicas, como já relatado em um estudo de Horie *et al.* (2005) que observou um efeito sinérgico das catequinas contidas no chá verde (epicatequina, epicatequina-3-galato e epigallocatequina-3-O-galato) sobre a indução de apoptose em linhagens celulares de carcinoma gástrico.

Sabe-se ainda, que existe uma estreita relação entre a úlcera e anormalidades da motilidade gastrointestinal (GARRICK *et al.*, 1990; TAKEUCHI *et al.*, 1990). Maity *et al.* (2001) confirmaram uma redução significativa no trânsito intestinal e no esvaziamento gástrico em ratos tratados com diversas substâncias ulcerogênicas. Sendo assim, foi avaliada a atividade do EHCV e EHCP sobre a motilidade gastrointestinal. Ambos foram capazes de aumentar o trânsito intestinal, o que pode representar um benefício adicional dos extratos na sintomatologia dispéptica global da úlcera. Corroborando estes dados, outros estudos de Chaudhuri *et al.* (2000) e Maity *et al.* (2001) também demonstraram o efeito pró-cinético de uma extração aquosa de chá preto, sugerindo ainda um envolvimento colinérgico, das PGs e do NO, no mecanismo de ação deste extrato sobre a motilidade gastrointestinal. Neste caso, as tearubigininas parecem ser as reponsáveis pelo efeito do chá preto (CHAUDHURI *et al.* 2000). Logo, ao contrário do que pudemos observar na gastroproteção, a condensação das catequinas parece aumentar o efeito pró-cinético da *Camellia sinensis*, visto que, curiosamente, no aumento do trânsito intestinal, o EHCP foi mais eficaz que o EHCV, necessitando de uma dose 3 vezes menor que o EHCV para produzir o mesmo percentual de aumento no trânsito intestinal.

Cabe salientar que, além da ação citoprotetora gástrica, as PGE₂ atuam também na regulação de funções intestinais (DEY *et al.*, 2006). Vários estudos (BOTELLA *et al.*, 1993; SHAHBAZIAN *et al.*, 2002; GRASA *et al.*, 2006 e TUNARU *et al.*, 2012) apontam que o aumento da peristalse intestinal está intimamente ligada a ativação de receptores prostanóides do subtipo EP1 e EP3, o que indica que os receptores prostanóides E (EP) são alvos potenciais para drogas com efeito laxante. Estes dados, somados ao aumento de muco desempenhado pelos extratos, especialmente no modelo de úlcera induzido por indometacina,

que diminui a produção de PGs, apóia a hipótese de que compostos presentes nos extratos EHCV e EHCP de alguma forma estejam atuando na via das PGs.

Tendo em vista o extenso uso popular dos chás da *Camellia sinensis* e a escassez de estudos sobre a toxicologia dessa espécie, nós avaliamos a toxicidade dos extratos e de suas frações. Muitas vezes, comparadas aos medicamentos usados nos tratamentos convencionais, a toxicidade de plantas medicinais pode parecer trivial, entretanto é um problema sério de saúde pública. Entre a população, é um equívoco generalizado pensar que "natural" sempre significa "seguro", e há uma crença comum de que os remédios de origem natural são inofensivos e não oferecem riscos à saúde (WHO, 2004). Entretanto, estudos clínicos mostram que muitas plantas contêm constituintes extremamente tóxicos, como os digitálicos, alcalóides pirrozilidínicos e ésteres do forbol (CALIXTO, 2001b). Os medicamentos a base de produtos naturais, como os demais, devem oferecer garantia dos efeitos terapêuticos e segurança de uso (ANVISA, 2014), e muitos efeitos tóxicos de drogas observados em animais podem ter elevado valor de aplicação na espécie humana, portanto é imprescindível esta avaliação em estudos científicos pré-clínicos. Desta maneira, é interessante notar que nossos resultados em relação à exposição repetida dos animais aos extratos e as frações não mostraram sinais de toxicidade, um fator bastante interessante ao considerarmos que o tratamento da úlcera geralmente compreende longos períodos de duração.

Coletivamente, os extratos hidroalcoólicos de chás verde e preto apresentaram um efeito gastroprotetor e cicatrizante gástrico importante, além de melhorar o trânsito intestinal. Ademais, através do fracionamento biomonitorado, as frações acetato de etila do chá verde e preto parecem concentrar os compostos ativos responsáveis pela ação destes extratos no trato gastrointestinal. Adicionalmente, a epigallocatequina-3-O-galato (EGCG), o composto majoritário da FAECV, pode estar envolvido no efeito gastroprotetor do chá verde. A ação benéfica dos chás da *Camellia sinensis* na úlcera possivelmente está associada à manutenção de muco gástrico, redução do estresse oxidativo e diminuição do processo inflamatório, embora mais estudos sejam necessários para confirmar os mecanismos e elucidar outros compostos químicos envolvidos nestes efeitos.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo nos permitem concluir que:

- O tratamento intraperitoneal com EHCV e EHCP protegeu a mucosa gástrica contra lesões induzidas por etanol em ratas;
- O tratamento oral com EHCV e EHCP, com as frações FBuCV, FAECV, FBuCP e FAECP, assim como, com a EGCG, apresentou atividade gastroprotetora contra lesões induzidas por indometacina em ratas;
- O efeito gastroprotetor contra a indometacina do EHCV, EHCP e de algumas frações, está associado à manutenção dos níveis de muco e GSH da mucosa gástrica;
- A redução de fatores agressores como a secreção ácida gástrica e a atividade péptica não estão envolvidos no mecanismo protetor do EHCV e do EHCP;
- A administração oral dos extratos, EHCV e EHCP, e das frações, FAECV e FAECP acelerou a cicatrização da úlcera crônica induzida por ácido acético 80%, mantendo os níveis de GSH, a atividade da SOD e diminuindo os níveis de lipoperoxidação lipídica;
- A cicatrização acelerada da úlcera gástrica desempenhada pelos extratos e frações também está relacionada com a diminuição do processo inflamatório através da redução da infiltração de neutrófilos;
- O efeito cicatrizante do EHCV, EHCP e das frações FAECV e FAECP, está associado à manutenção dos níveis de mucina gástrica;
- A EGCG administrada isoladamente não reduziu a úlcera crônica induzida por ácido acético 80%;
- Os extratos, EHCV e EHCP, administrados por via oral aumentaram o trânsito intestinal;
- O tratamento subcrônico com os extratos e frações não provocou sinais de toxicidade.

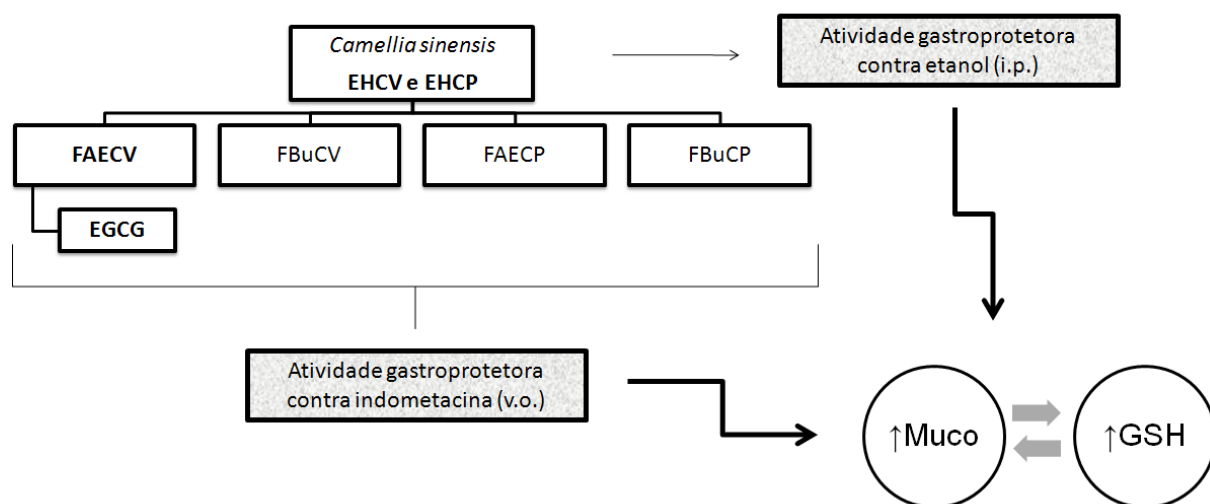


FIGURA 34 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO EFEITO DO EHCV, EHCP, FRAÇÕES E EGCG NAS LESÕES INDUZIDAS POR ETANOL E INDOMETACINA.

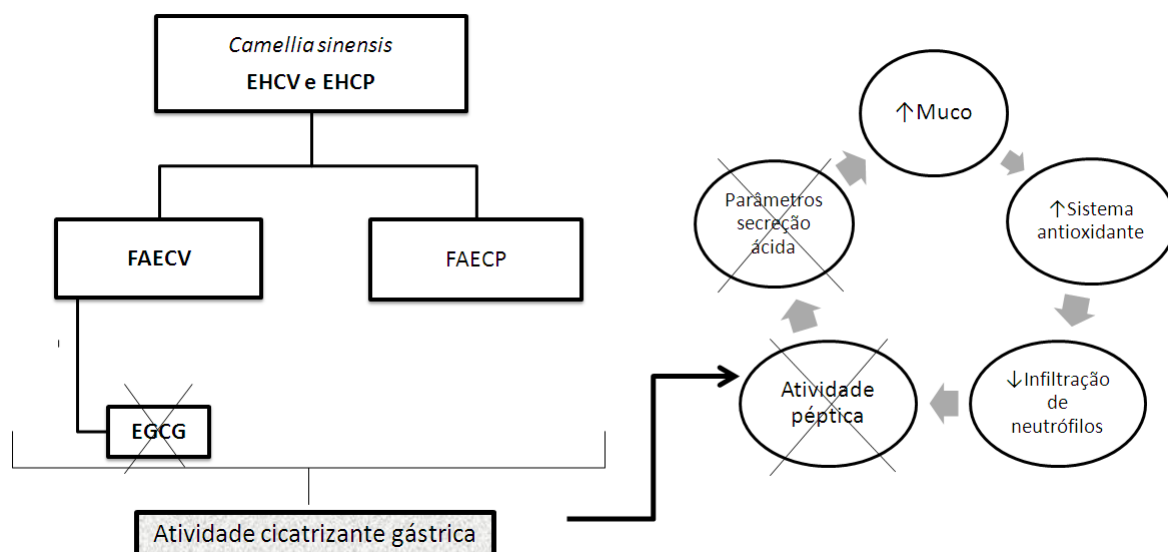


FIGURA 35 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO EFEITO DO EHCV, EHCP, FRAÇÕES E EGCG NAS LESÕES INDUZIDAS POR ÁCIDO ACÉTICO.

REFERÊNCIAS

ABIFISA. Associação Brasileira de Empresas do Setor Fitoterápico. **Suplemento Alimentar de Promoção da Saúde. Com relação a dados de mercado e a política do setor.** Disponível em: <<http://abifisa.org.br/faq.asp>> Acesso em: 5 jan 2014.

ADHIKARY, B.; YADAV, S. K.; BANDYOPADHYAY, S. K. e CHATTOPADHYAY, S. Epigallocatechin gallate accelerates healing of indomethacin-induced stomach ulcers in mice. **Pharmacol. Rep.** v. 2, n. 63, p. 527-536, 2011a.

ADHIKARY, B.; YADAV, S. K.; ROY, K.; BANDYOPADHYAY e S. K.; CHATTOPADHYAY, S. Black tea and theaflavins assist healing of indomethacin-induced gastric ulceration in mice by antioxidative action. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.** 2011b.

ADHIKARY, B.; YADAV, S. K.; BANDYOPADHYAY, S. K e CHATTOPADHYAY, S. Role of the COX-independent pathways in the ulcer-healing action of epigallocatechin gallate. **Food Funct.** v. 2, n. 6, p. 338-347, 2011c.

AKTAR, M. S. e MUNIR, M. Evaluation of the gastric antiulcerogenic effects of *Solanum nigrum*, *Brassica oleraceae* and *Ocimum basilicum* in rats. **J. Ethnopharmacol.** v. 27, n. 1-2, p. 163-176, 1989.

ALANKO, J.; RIUTTA, A.; HOLM, P.; MUCHA, I.; VAPAATALO, H. e METSA-KETELA, T. Modulation of arachidonic acid metabolism by phenols: Relation to their structure and antioxidant/pro-oxidant properties. **Free Radic. Biol. Med.** v. 26, n. 1-2, p. 193-201, 1999.

ALGOOD, H. M. e COVER, T. L. *Helicobacter pylori* persistence: an overview of interactions between *H. pylori* and host immune defenses. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 19, n. 4, p. 597-613, 2006.

ALMEIDA, E. R. **As plantas medicinais brasileiras.** São Paulo: Hemus, 339 p. 1993.

ALY, A. Prostaglandins in clinical treatment of gastroduodenal mucosal lesions: a review. **Scand. J. Gastroenterol.** v. 137, p. 43-49, 1987.

ANKOLEKAR, C.; JOHNSON, D.; PINTO, M. da S.; JOHNSON, K.; LABBE, R. e SHETTY, K. Inhibitory potential of tea polyphenolics and influence of extraction time against *Helicobacter pylori* and lack of inhibition of beneficial lactic acid bacteria. **J. Med. Food.** v. 14, n. 11, p. 1321-1329, 2011.

ANSON, M. L. The estimation of pepsin, trypsin, papain and catepsin with hemoglobin. **J. Gen. Physiol.** v. 22, p. 78-89, 1938.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacovigilância.** Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/posuso/farmacovigilancia>> Acesso em: 21 mar 2014.

ARAKAWA, T., WATANABE, T., TANIGAWA, T., TOMINAGA, K., FUJIWARA, Y. e MORIMOTO, K. Quality of ulcer healing in gastrointestinal tract: its pathophysiology and clinical relevance. **World J. Gastroenterol.** v. 18, n. 35, p. 4811-4822, 2012.

ARAUJO, C. C. e LEON, L. L. Biological activities of *Curcuma longa* L. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** n. 96, v. 5, p. 723-728, 2001.

ATAY, S.; TARNAWSKI, A. S. e DUBOIS, A. Eicosanoids and the stomach. **Prostaglandins Other Lipids Mediat.** v. 61, n. 3-4, p. 105-124, 2000.

AVILA, J. R.; DE LA LASTRA, C. A.; MARTIN, M. J.; MOTILVA, V.; LUQUE, I.; DELGADO, D.; ESTEBAN, J. e HERRERIAS, J. Role of endogenous sulphhydryls and neutrophil infiltration in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by piroxicam in rats. **Inflamm. Res.** v. 45, n. 2, p. 83-88, 1996.

BAGGIO, C. H., FREITAS, C. S., TWARDOWSCHY, A., DOS SANTOS, A. C., MAYER, B., POTRICH, F. B., CIPRIANI, T. R., SASSAKI, G. L., IACOMINI, M., MARQUES, M. C. e MESIA-VELAA, S. In vivo/in vitro studies of the effects of the type II arabinogalactan isolated from *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek on the gastrointestinal tract of rats. **Z. Naturforsch. C.** v. 67, n. 7-8, p. 405-410, 2012.

BAILEY, P. J. Sponge implants as models. **Methodol. Immunol.** v. 162, p. 327-334, 1988.

BANDYOPADHYAY, D.; BISWAS, K.; BHATTACHARYYA, M.; REITER, R. J. e BANERJEE, R. K. Gastric toxicity and mucosal ulceration induced by oxygen-derived reactive species: protection by melatonin. **Curr. Mol. Med.** v. 1, n. 4, p. 501-513, 2001.

BANERJEE, D.; HASSARAJANI, S. A.; MAITY, B.; NARAYAN, G.; BANDYOPADHYAY, S. K. e CHATTOPADHYAY, S. Comparative healing property of kombucha tea and black tea against indomethacin-induced gastric ulceration in mice: possible mechanism of action. **Food Funct.** v. 1, n. 3, p. 284-293, 2010.

BASU, A. e LUCAS, E. Mechanisms and effects of green tea on cardiovascular health. **Nutr. Rev.** v. 65, n. 8 Pt 1, p. 361-365, 2007.

BERNE, R. M.; LEVY, M. N.; KOEPPEN, B. M. e STANTON, B. A. **Fisiologia.** 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

BERSTAD, A. E.; BERSTAD, K. e BERSTAD, A. PH-activated phospholipase A2: an important mucosal barrier breaker in peptic ulcer disease. **Scand. J. Gastroenterol.** v. 37, n. 6, p. 738-742, 2002.

BERTRAND, V.; GUESSOUS, F.; LE ROY, A. L.; VIOSSAT, B.; FESSI, H.; EL ABOUYI, A.; GIROUD, J. P. e ROCH-ARVEILLER, M. Copper indomethacin associated with zwitterionic phospholipids prevents enteropathy in rats: effect on inducible NO synthase. **Dig. Dis. Sci.** v. 44, n. 5, p. 991-999, 1999.

BOGLIOLO, Luigi e BRASILEIRO FILHO, Geraldo. **Bogliolo patologia.** 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1501 p., 2011.

BORELLI, F. e IZZO, A. A. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. **Phytot. Res.** v. 14, n. 8, p. 581-591. 2000.

BOTELLA, A.; DELVAUX, M.; FIORAMONTI, J.; FREXINOS, J.; BUENO, L. Stimulatory (EP1 and EP3) and inhibitory (EP2) prostaglandin E2 receptors in isolated ileal smooth muscle cells. **Eur. J. Pharmacol.** 237, p. 131-137, 1993.

BOU-ABBOUD, C. F.; WAYLAND, H.; PANLSEN, G. e GUTH, P. H. Microcirculatory stasis precedes tissue necrosis in ethanol-induced gastric mucosal injury in rat. **Dig. Dis. Sci.**, v. 33, n. 7, p. 872-877, 1988.

BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D. e ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J. Invest. Dermatol.** v. 78, n. 3, p. 206-209, 1982.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. **Riqueza de espécies**. Disponível em <http://www.mma.gov.br/port/sbf/chm/biodiv/brasil.html>. Acesso em: 12 mai 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada nº 48 de 16 de março de 2004. Aprova o regulamento técnico de medicamentos fitoterápicos junto ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária. DOU. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, DF, Brasília, 18 mar de 2004.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 11 ed. United States of America: Mc Graw-Hill Companies, Inc., 2006.

CALDER, M. D.; CAENEY, A. N.; WESTHUSIAN, M. E. e WATSON, A. J. Cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 (PGE2) receptor messenger RNAs are affected by bovine oocyte maturation time and cumulus-oocyte complex quality, and PGE2 induces moderate expansion of the bovine cumulus in vitro. **Biol. Reprod.** v. 65, n. 1, p. 135-140, 2001.

CALIXTO, J. B.; SCHEIDT, C.; OTUKI, M. e SANTOS, A. R. Biological activity of plant extracts: novel analgesic drugs. **Expert Opin. Emerg. Drugs.** v. 6, n. 2, p. 261-279, 2001a.

CALIXTO, J. B. Estudo farmacológico pré-clínico de plantas medicinais. In: CALIXTO, J. B. e YUNES, R. A. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Santa Catarina: Argos, p. 77-99, 2001b.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **J. Ethnopharmacol.** v. 100, n. 1-2, p. 131-134, 2005.

CARVALHO, A. S. T. Úlcera péptica. **J. Pediatría**, v. 76, p. 127-134, 2000.

CENTANNI, M.; GARGANO, L.; CANETTIERI, G.; VICECONTI, N.; FRANCHI, A.; DELLE FAVE, G. e ANNIBALE, B. Thyroxine in goiter, *Helicobacter pylori* infection, and chronic gastritis. **N. Engl. J. Med.** v. 354, n. 17, p. 1787-1795, 2006.

CHAUDHURI, L.; BASU, S.; SETH, P.; CHAUDHURI, T.; BESRA, S. E. VEDASIROMONI, J. R. e GANGULY, D. K. Prokinetic effect of black tea on gastrointestinal motility. **Life Sci.** v. 66, n. 9, p. 847-854, 2000.

CHEN, D.; MILACIC, V.; CHEN, M. S.; WAN, S. B.; LAM, W. H.; HUO, C.; LANDIS-PIWOWAR, K. R.; CUI, Q. C.; WALI, A.; CHAN, T. H. e DOU, Q. P. Tea polyphenols, their biological effects and potential molecular targets. **Histol. Histopathol.** v. 23, n. 4, p. 487-96, 2008.

CHEN, L.; LEE, M.; LI, H. e YANG, C.S. Absorption, distribution, and elimination of tea polyphenols in rats. **Drug Metab. Dispos.** v. 25, n. 9, p. 1045-1050, 1997.

CHIOU, S. K.; TANIGAWA, T.; AKAHOSHI, T.; ABDELKARIM, B.; JONES, M. K. e TARNAWSKI, A. S. Survivina novel target for indomethacin-induced gastric injury. **Gastroenterol.** v. 128, n. 1, p. 63-73, 2005.

CHUBINEH, S. e BIRK, J. Proton pump inhibitors: the good, the bad, and the unwanted. **South Med. J.** v. 105, n. 11, p. 613-618, 2012.

CNUBBEN, N. H.; RIETJENS, I. M.; WORTELBOER, H.; VAN ZANDEN, J. e VAN BLADEREN, P. J. The interplay of glutathione-released process in antioxidant defense. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** v. 10, n. 4, p. 141-152, 2001.

COOPER, R.; MORRE, J. e MORRE, D. Medicinal benefits of green tea: Part I and II. Review of anticancer properties. **J. Altern. Complement. Med.** v. 11, n. 4, p. 639–652, 2005.

CORNE, S. J.; MORRISSEY, S. M. e WOODS, R. J. Proceedings: a method for the quantitative estimation of gastric barrier mucus. **J. Physiol.** v. 242, p. 116–117, 1974.

DANIELSON, U. H. e MANNERVIK, B. Kinetic independence of the subunits of cytosolic glutathione transferase from the rat. **Biochem. J.** v. 231, n. 2, p. 263-267, 1985.

DAVIDE, J. **Úlcera gastroduodenal.** 2009. Disponível em <<http://www.alert-online.com/pt/medical-guide/ulcera-gastroduodenal>> Acesso em 13 mar 2014.

DE FONESKA, A. e KAUNITZ, J. D. Gastroduodenal mucosal defense. **Curr. Opin. Gastroenterol.** v. 26, n. 6, p. 604–610, 2010.

DE MEJIA, E. G.; RAMIREZ-MARES, M. V. e PUANGPRAPHANT, S. Bioactive components of tea: cancer, inflammation and behavior. **Brain Behav. Immun.** v. 23, n. 6, p. 721-731, 2009.

DE YOUNG, L. M.; KHEIFETS, J. B.; BALLARON, S. J. e YOUNG, J. M. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents Act.** v. 26, n. 3-4, p. 335-341, 1989.

DEVINE, A.; HODGSON, J. M.; DICK, I. M. e PRINCE, R. L. Tea drinking is associated with benefits on bone density in older women. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 86, n. 4, p. 1243-1247, 2007.

DEY, I.; LEJEUNE, M. e CHADEE, K. Prostaglandin E2 receptor distribution and function in the gastrointestinal tract. **Br. J. Pharmacol.** v. 149, n. 6, p. 611-623, 2006.

DIAZ-RUBIO, M. Historical perspective of gastric acid inhibition. **Drugs.** v. 65, n. 1, p.1-6, 2005.

DOMER, F. R. Animail experiments in pharmacological analysis. Charles C. Thomas **Publish.** p. 669, 1971.

ENGELHARDT, U.H. Chemistry of tea. In: **Comprehensive Natural Products II.** v. 3, p. 999-1032, 2010.

FBG. Federação Brasileira de Gastroenterologia. **Projeto Diretrizes. Úlcera Péptica.** 31 de janeiro de 2003. Disponível em: <http://www.projetodiretrizes.org.br/projeto_diretrizes/106.pdf> Acesso em: 21 jan 2014.

FBG. Federação Brasileira de Gastroenterologia. **Úlceras Pépticas.** Disponível em: <<http://www.fbg.org.br/Textos.asp?Codigo=194>> Acesso em: 5 jun 2014.

FERREIRA, A. L. A. e MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras.** v. 43, n.1, p. 61-68, 1997.

FESHAREKI, M.; NASIMI, A.; MORKHTARI, S.; MORKHTARI, R.; MORADIAN, R. e AMIRPOOR, N. Reactive oxygen metabolites and anti-oxidative defenses in aspirin-induced gastric damage in rats: Gastroprotection by Vitamin E. **Pathophysiol.** v. 13, n. 4, p. 237-243, 2006.

FORNAI, M.; NATALE, G.; COLUCCI, R.; TUCCORI, M.; CARAZZINA, G.; ANTONIOLI, L.; BALDI, S.; LUBRANO, V.; ABRAMO, A.; BLANDIZZI, C. e DEL TACCA, M. Mechanisms of protection by pantoprazole against NSAID-induced gastric mucosal damage. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.** v. 372, n. 1, p. 79-87, 2005.

GAO, R.; YUAN, Z.; ZHAO, Z. e GAO, X. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dimutase enzyme activity. **Bioelectrochem. Bioenerg.** v. 45, n. 1, p. 41-45, 1998.

GARCIA-RODRIGUEZ, L. A. e RUIGOMEZ, A. Use of acid suppressing drugs and the risk of bacterial gastroenteritis. **Clin. Gastroenterol. Hepatol.** v. 5, n.12, p.1418-1423, 2007.

GARRICK, T.; BUACK, S. e BASS, P. Gastric motility is a major factor in cold restraint-induced lesion formation in rats. **Am. J. Physiol.** v. 250, n. 2Pt1, p. G191-199, 1986.

GINZBURG, L. e MAGE, S. Failure following gastroenterostomy for gastroduodenal ulcer. **Surg. Gynecol. Obstet.** v. 67, p. 788-795, 1938.

GILL, J. M.; PLAYER, M. S. e METZ, D. C. Balancing the risks and benefits of proton pump inhibitors. **Ann. Fam. Med.** v. 9, n. 3, p. 200-202, 2011.

GUSTAFSON, J. e WELLING, D. “No acid, no ulcer” – 100 years later: a review of the history of peptic ulcer disease. **J. Am. Coll. Surg.** v. 210, p. 110-116, 2010.

GRANT, C. M. Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. **Mol. Microbiol.** v. 39, n. 3, p. 533-541, 2001.

GRASA, L.; ARRUEBO, M. P.; PLAZA, M. A. e MURILLO, M. D. PGE2 receptors and their intracellular mechanisms in rabbit small intestine. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.** 79, n. 3-4, p. 206–217, 2006.

HABIG, W. H.; PABST, M. J. e JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J. Biol. Chem.** v. 249, n. 22, p. 7130-7139, 1974.

HALLIWELL, B. e GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine.** 2 ed. Oxford, London: Clarendon Press, 1989.

HALTER, F.; TARNAWSKI, A. S.; SCHAMASSMAN, A. e PESKAR, B. M. Cyclooxygenase-2 implications on maintenance of gastric mucosal integrity and ulcer healing: controversies and perspectives. **Gut.** v. 49, n. 3, p. 443-453, 2001.

HAMAISHI, K.; KOJIMA, R. e ITO, M. Anti-ulcer effect of tea catechin in rats. **Biol. Pharm. Bull.** v. 29, n. 11, p. 2206-13, 2006.

HAUSER, S. C. Mayo **Clinic Gastroenterology and Hepatology Board Review.** 4 ed. Oxford: University Press. p. 49, 2011.

HELLOU, J.; ROSS, N. W.; MOON, T. W. Glutathione, glutathione S-transferase and glutathione conjugates, complementary markers of oxidative stress in aquatic biota. **Environ. Sci. Pollut. Res.** v. 19, n. 6, p. 2007-2023, 2012.

HOLZER, P. e SAMETZ, W. Gastric mucosal protection against ulcerogenic factors in the rat mediated by capsaicin-sensitive afferent neurons. **Gastroenterol.** v. 91, n. 4, p. 975–981, 1986.

HORIE, N.; HIRABAYASHI, N.; TAKAHASHI, Y.; MIYAUCHI, Y.; TAGUCHI, H.; TAKEISHI, K. Synergistic effect of green tea catechins on cell growth and apoptosis induction in gastric carcinoma cells. **Biol. Pharm. Bull.** v. 28, n. 4, p. 574-579, 2005.

IM, W. J.; NAM, Y.; PARK, S. Y. e SOHN, U. D. Gastroprotective effect of the three glucuronopyranoside flavonoids in rats. **Korean J. Physiol. Pharmacol.** v. 17, n. 5, p. 411-415, 2013.

IMS HEALTH. Intercontinental Marketing Services. **Company Information.** Disponível em: <<http://www.imshealth.com>> Acesso em: 6 jul 2014.

JIANG, Z. Y.; WOOLLARD, A. C. e WOLFF, S. P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids.** v. 26, n. 10, p. 853–856, 1991.

JONES, M. K.; PADILLA, O. R. e ZHU, E. Survivin is a key factor in the differential susceptibility of gastric endothelial and epithelial cells to alcohol-induced injury. **J. Physiol. Pharmacol.** v. 61, n. 3, p. 253-264, 2010.

JONES, M. K.; WANG, H.; PESKAR, B. M.; LEVIN, E.; ITANI, R. M.; SARFEH, I. J. e TARNAWSKI, A. S. Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: Insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing. **Nat. Med.** v. 5, n. 12, p. 1418-1423, 1999.

JORGE, R. M.; LEITE, J. P.; OLIVEIRA, A. B. e TAGLIATI, C. A. Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. **J. Ethnopharmacol.** v. 94, n. 1, p. 93-100, 2004.

KALLAYA, E.; SUTHILUK, P.; NARUEMON, V. e DUANGPORN, T. Effects of *Aloe vera* and sucralfate on gastric microcirculatory changes, cytokine levels and gastric ulcer healing in rats. **World J. Gastroenterol.** v. 7, n. 12, p. 2034-2039, 2006.

KALIA, N.; BARDHAN, K. D.; REED, M. W.; JACOB, S. e BROWN, N. J. Mast cell stabilization prevents ethanol-induced rat gastric injury: mechanisms of protection. **J. Gastroenterol. Hepatol.** v. 15, n. 2, p. 133-141, 2000.

KANGWAN, N.; PARK, J. M.; KIM, E. H. e HAHM, K. B. Quality of healing of gastric ulcers: Natural products beyond acid suppression. **World J. Gastrointest. Pathophysiol.** v. 5, n. 1, p. 40-47, 2014.

KOBAYASHI, T.; OHTA, Y.; YOSHINO, J. e NAKAZAWA, S. Teprenone promotes the healing of acetic acid-induced chronic gastric ulcers in rats by inhibiting neutrophil infiltration and lipid peroxidation in ulcerated gastric tissues. **Pharmacol. Res.** v. 43, n. 1, p. 23-30, 2001.

KONTUREK, S. J.; KONTUREK, P. C.; KONTUREK, J. W.; PLONKA, M.; CZESNIKIEWICZ-GUZIŁ, M.; BRZOZOWSKI, T. e BIELANSKI, W. *Helicobacter pylori* and its involvement in gastritis and peptic ulcer formation. **J. Physiol. Pharmacol.** v. 57, Sup. 3, p. 29-50, 2006.

KUMUDAVALLY, K. V.; PHANINDRAKUMAR, H. S.; TABASSUM, A.; RADHAKRISHNA, K. e BAWA, A. S. Green tea - a potential preservative for extending the shelf life of fresh mutton at ambient temperature (25 ± 2 °C). **Food Chem.** v. 107, n. 1, p. 426-433, 2008.

KURIYAMA, S.; HOZAWA, A.; OHMORI, K.; SHIMAZU, T.; MATSUI, T.; AWATA, S.; NAGATOMI, R.; ARAI, H. e TSUJI, I. Green tea consumption and cognitive function: a cross-sectional study from the Tsurugaya Project 1. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 83, n. 2, p. 355-361, 2006.

LAHLOU, M. The success of natural products in drug discovery. **Pharmacol. Pharm.** v. 4, n. 3A, p. 17-31, 2013.

LAINE, L.; TAKEUCHI, K. e TARNAWSKI, A. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. **Gastroenterol.** v. 135, n. 1, p. 41-60, 2008.

LAU, J. Y.; SUNG, J.; HILL, C.; HENDERSON, C.; HOWDEN, C. W. e METZ, D. C. Systematic review of the epidemiology of complicated peptic ulcer disease: incidence, recurrence, risk factors and mortality. **Digest.** v. 84, n. 2, p. 102-113, 2011.

LEE, K. M.; YEO, M.; CHOUE, J. S.; JIN, J. H.; PARK, S. J.; CHEONG, J. Y.; LEE, K. J.; KIM, J. H. e Hahm, K. B. Protective mechanism of epigallocatechin-3-gallate against *Helicobacter pylori* induced gastric epithelial cytotoxicity via the blockage of TLR-4 signaling. **Helicobac.** v. 9, n. 6, p. 632-642, 2004.

LEE, M. J.; MALIAKAL, P.; CHEN, L.; MENG, X.; BONDOC, F.Y.; PRABHU, S.; LAMBERT, G.; MOHR, S. e YANG, C. S. Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.** v. 11, n. 10Pt1, p. 1025-1032, 2002.

LEE, S.; PARK, M. K.; KIM, K. H. e KIM, Y. S. Effect of supercritical carbon dioxide decaffeination on volatile components of green tea. **J. Food Sci.** v. 72, n. 7, p. S497-S502, 2007.

LIN, K.J.; GARCIA-RODRIGUEZ, L. A.; HERNÁNDEZ-DÍAZ, S. Systematic review of peptic ulcer disease incidence rates: do studies without validation provide reliable estimates? **Pharmacoepidemiol. Drug. Saf.** v. 20, n. 7, p. 718-728, 2011.

LOURENÇO K. G. e OLIVEIRA, R. B. Abordagem do paciente com hemorragia digestiva alta não varicosa. **Medicina, Ribeirão Preto.** v. 36, p. 261-265, 2003.

MAHADY, G. B.; PENDLAND, S. L.; YUN, G. e LU, Z. Z. Turmeric (*Curcuma longa*) and curcumin inhibit the growth of *Helicobacter pylori*, a group 1 carcinogen. **Anticancer Res.** v. 22, n. 6C, p. 4179-4181, 2002.

MAITY, P; BISWAS, K.; ROY, S.; BANERJEE, R. K e BANDYOPADHYAY, U. Smoking and the pathogenesis of gastroduodenal ulcer – recent mechanistic update. **Mol. Cell. Biochem.** v. 253, n. 1-2, p. 329-38, 2003.

MAITY, S.; VEDASIROMONI, J. R. e GANGULY, D. K. Anti-ulcer effect of the hot water extract of black tea (*Camellia sinensis*). **J. Ethnopharmacol.** v. 46, n. 3, p. 167-174, 1995,

MAITY, S.; VEDASIROMONI, J. R.; CHAUDHURI, L. e GANGULY, D. K. Role of reduced glutathione and nitric oxide in the black tea extract-mediated protection against ulcerogen-induced changes in motility and gastric emptying in rats. **Jpn. J. Pharmacol.** v. 85, n. 4, p. 358-364, 2001.

MALMI, H.; KAUTIAINEN, H.; VIRTÄ, L. J.; FÄRKKILÄ, N.; KOSKENPATO, J. e FÄRKKILÄ, M. A. Incidence and complications of peptic ulcer disease requiring hospitalisation have markedly decreased in Finland. **Aliment. Pharmacol. Ther.** v. 39, n. 5, p. 496-506, 2014.

MANIAN, R.; ANUSUYA, N.; SIDDHURAJU, P. e MANIAN, S. The antioxidant activity and free radical scavenging potential of two different solvent extracts of *Camellia sinensis*

(L.) O. Kuntz, *Ficus bengalensis* L. and *Ficus racemosa* L. **Food Chem.** v. 107, n. 3, p. 1000-1007, 2007.

MARKLUND, S. e MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **Eur. J. Biochem.** v. 47, n. 3, p. 469-474, 1974.

MATHY-HARTERT, M.; BOURGEOIS, E.; GRULKE, S.; DEBY-DUPONT, G.; CAUDRON, I.; DEBY, C.; LAMY, M. e SERTEYN, D. Purification of myeloperoxidase from equine polymorphonuclear leucocytes. **Can. J. Vet. Res.** v. 62, n. 2, p. 127-132, 1998.

MATSUZAKI, T. L. e HARA, Y. Antioxidative activity of tea leaf catechins. **Nippon Nogeikaku Kaishi**, v. 59, p. 129-134, 1985.

MILANI, S. e CALABRO, A. Role of growth factors and their receptors in gastric ulcer healing. **Microsc. Res. Tech.** v. 53, n. 5, p. 360-371, 2001.

MINEHARU, Y.; KOIZUMI, A.; WADA, Y.; ISO, H.; WATANABE, Y.; DATE, C. YAMAMOTO, A.; KIKUCHI, S.; INABA, Y.; TOYOSHIMA, H.; KONDO, I. e TAMAKOSHI, A.; JACC STUDY GROUP. Coffee, green tea, black tea and oolong tea consumption and risk of mortality from cardiovascular disease in Japanese men and women. **J. Epidemiol. Community Health.** v. 65, n. 3, p. 230-40, 2011.

MORIKAWA, T.; LI, N.; NAGATOMO, A.; MATSUDA, H.; LI, X. e YOSHIKAWA, M. Triterpene saponins with gastroprotective effects from tea seed (the seeds of *Camellia sinensis*). **J. Natural Produc.** v. 69, n. 2, p. 185-190, 2006.

MORIMOTO, Y.; SHIMOHARA, K.; OSHIMA, S. e SUKAMOTO, T. Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of terpenone and cimetidine. **Jap. J. Pharmacol.** v. 57, n. 4, p. 495-505, 1991.

MOWRY, R. W. e WINKER, C. H. The coloration of acidic carbohydrates of bacteria and fungi in tissue sections with special reference to capsules of *Cryptococcus neoformans*, *Pneumococci* and *Staphylococci*. **Am. J. Pathol.** v. 32, p. 628-629, 1956.

MUSUMBA, C.; JORGENSEN, A.; SUTTON, L.; VAN EKER, D.; MOORCROFT, J.; HOPKINS, M.; PRITCHARD, D. M. e PIRMOHAMED, M. The relative contribution of NSAIDs and *Helicobacter pylori* to the aetiology of endoscopically-diagnosed peptic ulcer disease: observations from a tertiary referral hospital in the UK between 2005 and 2010. **Aliment. Pharmacol. Ther.** v. 36, n. 1, p. 48-56, 2012.

NAKAO, K.; RO, A. e KIBAYASHI, K. Evaluation of the morphological changes of gastric mucosa induced by a low concentration of acetic acid using a rat model. **J. Forensic Leg. Med.** v. 22, p. 99-106, 2014.

NGUYEN, T.; CHAI, J.; LI, A.; AKAHOSHI, T.; TANIGAWA, T. e TARNAWSKI, A. S. Novel roles of local Insulin - Like Growth Factor activation in gastric ulcer healing: promotes actin polymerization, cell proliferation, reepithelialization and induces COX-2 in PI3K-dependent manner. **Am. J. Pathol.** v. 170, n. 4, p. 1219-1228, 2007.

NISHIDA, K.; OHTA, Y.; KOBAYASHI, T. e ISHIGURO, I. Involvement of the xanthine-xanthine oxidase system and neutrophils in the development of acute gastric mucosal lesions in rats with water immersion restraint stress. **Digest.** v. 58, n. 4, p. 340–351, 1997.

NISHIYAMA, M. F.; COSTA, M. A. F.; COSTA, A. M.; SOUZA, C. G. M.; BÔER, C. G.; BRACHT, C. K. e PERALTA, R. M. Chá verde brasileiro (*Camellia sinensis* var *assamica*): efeitos do tempo de infusão, acondicionamento da erva e forma de preparo sobre a eficiência de extração dos bioativos e sobre a estabilidade da bebida. **Cienc. Tecnol. Alim.** v. 30, supl. 1, ISSN 0101-2061, 2010.

NORDBERG, J. e ARNER, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalia thioredoxin system. **Free Radical Biol. Med.** v. 31, n.11, p. 1287-1312, 2001.

OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. **Guidelines for testing of chemicals, 423: Acute oral toxicity - Acute toxic class method, adopted.** Paris: OECD, 1996.

OFMAN, J. J.; ETCHASON, J.; ALEXANDER, W.; STEVENS, B. R.; HERRIN, J.; CANGIALOSE, C.; BALLARD, D. J.; BRATZLER, D.; ELWARD, K. S.; FITZGERALD, D.; CULPEPPER-MORGAN, J. e MARSHALL, B. The quality of care for medicare patients with peptic ulcer disease. **Am. J.Gastroenterol.** v. 95, n. 1, p. 106-113, 2000.

OKABE, S.; AMAGASE, K. e TAKEUCHI, K. Acetic acid ulcer model – state of the art in 2012. In: FILARETOVA, L. P.; TAKEUCHI, K. editors. Cell/Tissue injury and cytoprotection/organoprotection in the gastrointestinal tract: mechanisms, prevention and treatment. **Digest.** v. 86, n. 1, p. 32-40, 2012.

OKABE, S.; ROTH, J. L. e PFEIFFER, C. J. A method for experimental, penetrating gastric and duodenal ulcers in rats. Observations on normal healing. **Am. J. Dig. Dis.** v. 16, n. 3, p. 277–284, 1971.

OKADA, S.; TAKAHASHI, N.; OHARA, N.; UCHIMURA, T. e KOZAKI, M. Microorganisms involving in the fermentation of Japanese fermented tea leaves Part II. Microorganisms in fermentation of goishi-cha, Japanese fermented tea leaves. **Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi.** v. 43, p. 1019-1027, 1996.

PANDYA, K. M.; MAGLIOCCO, M.; MALAVIYA, R. e YAO, M. The effects of topically applied constituents of green tea (caffeine or (-)-epigallocatechin; EGCG) on UV-induced increase in p53 and apoptotic markers in the skin of human volunteers, a pilot study. **J. Am. Acad. Dermatol.** v. 50, n. 3, p. 122, 2004.

PEREIRA, I. T.; BURCI, L. M.; DA SILVA, L. M.; BAGGIO, C. H.; HELLER, M.; MICKE, G. A.; PIZZOLATTI, M. G.; MARQUES, M. C. e WERNER, M. F. Antiulcer effect of bark extract of *Tabebuia avellanedae*: activation of cell proliferation in gastric mucosa during the healing process. **Phytother. Res.** v. 27, n. 7, p. 1067-1073, 2012.

PERINI, R.; FIORUCCI, S. e WALLACE, J. L. Mechanisms of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastrointestinal injury and repair: a window of opportunity for cyclooxygenase-inhibiting nitric oxide donors. **Can. J. Gastroenterol.** v. 18, n. 4, p. 229-236, 2004.

POTRICH, F. B.; ALLEMAND, A.; DA SILVA, L. M.; DOS SANTOS, A. C.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MENDES, D. A.; ANDRE, E.; WERNER, M. F. e MARQUES, M. C. Antiulcerogenic activity of hydroalcoholic extract of *Achillea millefolium* L.: involvement of the antioxidant system. **J. Ethnopharmacol.** v. 130, n. 1, p. 85-92, 2010.

PRUCKSUNAND, C.; INDRASUKHSRI, B.; LEETHOCHAWALIT, M.; HUNGSPREUGS, K. Phase II clinical trial on effect of the long turmeric (*Curcuma longa* Linn) on healing of peptic ulcer. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.** v. 32, n. 1, p. 208-215, 2001.

RAGHUNATH, A. S.; O'MORAIN, C. e MCLOUGHLIN, R. C. Review article: the long-term use of proton-pump inhibitors. **Aliment. Pharmacol. Ther.** v. 22, n. 1, p. 55-63, 2005.

RAHMAN, S. Z. e SINGHAL, K. C. Problems in pharmacovigilance of medicinal products of herbal origin and means to minimize them. **Uppsalla Reports** 17. January Supplement, 2002.

RAMAKRISHNAN, K.; SALINAS, R. C. Peptic Ulcer Disease. **Am. Fam. Physician.** v. 76, n. 7, p. 1005-1012, 2007.

RAUFMAN, J. P. Peptic activity and gastroduodenal mucosal damage. **Yale J. Biol. Med.** v. 69, n. 1, p. 85-90, 1996.

RIMBARA, E.; FISCHBACH, L. A. e GRAHAM, D. Y. Optimal therapy for *Helicobacter pylori* infections. **Gastroenterol. Hepatol.** v. 8, p. 79-88, 2011.

ROBBINS, S. L.; KUMAR, V.; ABBAS, A. K. e ASTER, J. C. **Robbins patologia básica.** Rio de Janeiro: Saunders Elsevier, 910 p., 2013.

ROBERT, A.; NEZAMIS, J. E.; LANCASTER, C. e HANCHAR, A. J. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury. **Gastroenterol.** v. 77, n. 3, p. 433-443, 1979.

ROZZA, A. L.; HIRUMA-LIMA, C. A.; TANIMOTO, A. e PELLIZZON, C. H. Morphologic and pharmacological investigations in the epicatechin gastroprotective effect. **Evidence Based Complement. Alternat. Medicin.,** ID 708156, p. 1-8, 2012.

SAE-TAN, S.; GROVE, K. A. e LAMBERT, J. D. Weight control and prevention of metabolic syndrome by green tea. **Pharmacol. Res.** v. 64, n. 2, p. 146-54, 2011.

SANTOS, A. C.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; LEPIESZYNSKI, J.; MAYER, B.; TWARDOWSCHY, A.; MISSAU, F. C.; DOS SANTOS, E. P.; PIZZOLATTI, M. G. e MARQUES, M. C. Gastroprotective activity of the chloroform extract of the roots from *Arctium lappa* L. **J. Pharm. Pharmacol.** v. 60, n. 6, p. 795-801, 2008.

SATO, T.; AMANO, H.; ITO, Y.; ESHIMA, K.; MINAMINO, T.; AE, T.; KATADA C.; OHNO, T.; HOSONO, K.; SUZUKI, T.; SHIBUYA, M.; KOIZUMI, W. e MAJIMA, M. F. Vascular endothelial growth factor receptor 1 signaling facilitates gastric ulcer healing and angiogenesis through the upregulation of epidermal growth factor expression on VEGFR1+CXCR4 + cells recruited from bone marrow. **J. Gastroenterol.** v. 49, n. 3, p. 455-469, 2014.

SCALBERT, A.; IAN, T.; JOHNSON, I. T. e SALTMARSH, M. Polyphenols: antioxidants and beyond. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 81, n. 1, p. 215S–217S, 2005.

SCHUBERT, M. L. e PEURA, D. A. Control of gastric acid secretion in health and disease. **Gastroenterol.** v. 134, n. 7, p. 1842-1860, 2008.

SCOPARO, C. T. Análise dos polissacarídeos presentes em *Camellia sinensis* e desenvolvimento de cromatografia líquida bidimensional abrangente para compostos de baixa massa molecular. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Paraná, 107 p., 2010.

SCOPARO, C. T.; DE SOUZA, L. M.; DARTORA, N.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. e IACOMINI, M. Analysis of *Camellia sinensis* green and black teas via ultra high performance liquid chromatography assisted by liquid–liquid partition and two-dimensional liquid chromatography (size exclusion x reversed phase). **J. Chromatogr. A.** v. 1222, p. 29-37, 2012.

SCOPARO, C. T.; BORATO, D. G.; SOUZA, L. M.; DARTORA, N.; SILVA, L. M.; FERREIRA-MARIA, D.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; BAGGIO, C. H. e IACOMINI, M. Gastroprotective bio-guiding fractionation of hydroalcoholic extracts from green- and black-teas (*Camellia sinensis*). **Food Res. Internation.** v. 64, p. 577-586, 2014.

SEDLAK, J. e LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal. Biochem.** v. 25, n. 1, p. 192–205, 1968.

SENGER, A. E.; SCHAEANKE, C. H. A. e GOTTIEB, M. G. V. Chá verde (*Camellia sinensis*) e suas propriedades funcionais nas doenças crônicas não transmissíveis. **Sci. Med.** v. 20, n. 4, p. 292-300, 2010.

SHAHBAZIAN, A.; HEINEMANN, A.; PESKAR, B. A. e HOLZER, P. Differential peristaltic motor effects of prostanoid (DP, EP, IP, TP) and leukotriene receptor agonists in the guinea-pig isolated small intestine. **Br. J. Pharmacol.** v. 137, n. 7, p. 1047-1054, 2002.

SHARANGI, A. B. Medicinal and therapeutic potentialities of tea (*Camellia sinensis* L.) - A review. **Food Res. Int.** v. 42, n. 5-6, p. 529-535, 2009.

SHAY, H.; KOMAROV, S. A.; FELLS, S. S.; MERANZE, D.; GRUENSTEIN, M.; SIPLET, H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in rat. **Gastroenterol.** v. 5, p. 43–61, 1945.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A. e PETROVICK, PR (ORG.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2004.

SOUZA-FORMIGONI, M. L. Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. **J. Ethnopharmacol.** v. 34, n. 1, p. 21-27, 1991.

SPARG, S. G.; LIGHT, M. E. e VAN STADEN, J. Biological activities and distribution of plant saponins. **J. Ethnopharmacol.** v. 94, n. 2-3, p. 219-243, 2004.

SUCHITRA, A. D.; DKHAR, S. A.; SHEWADE, D. G. e SHASHINDRAN, C. H. Relative efficacy of some prokinetic drugs in morphine-induced gastrointestinal transit delay in mice. **World J. Gastroenterol.** v. 9, n. 4, p. 779-783, 2003.

SULEYMAN, H.; CADIRCI, E.; ALBAYRAK, A.; POLAT, B.; HALICI, Z.; KOC, F.; HACIMUFTUOGLU, A. e BAYIR, Y. Comparative study on the gastroprotective potential of some antidepressants in indomethacin-induced ulcer in rats. **Chem. Biol. Interact.**, v. 180, n. 2, p. 318-324, 2009.

SZABO, S.; TRIER, J. S.; BROWN, A. e SCHNOOR, J. Early vascular injury and increased vascular permeability in gastric mucosal injury caused by ethanol in the rat. **Gastroenterol.** v. 88, n. 1Pt2, p. 228-36, 1985.

TAKAGI, E.; OKABE, S. e SAZIKI, R. A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and effect of several drugs on healing. **Jpn. J. Pharmacol.** v. 19, n. 3, p. 416-426, 1969.

TAKEO, T. Green tea and semi-fermented teas. In: WILSON, K. C.; CLIFFORD, M. N. editors. Tea cultivation to consumption. London: **Chapman and Hall**, p. 413-414, 1992.

TAKEUCHI, K.; FURUKAWA, O.; NISHIWAKI, H. e OKABE, S. 16,16-Dimethyl prostaglandin E2 aggravates gastric mucosal injury induced by histamine in rats. Possible role of the increased mucosal vascular permeability. **Gastroenterol.** v. 93, n. 6, p. 1276-1286, 1987.

TAKEUCHI, K.; OKADA, M.; EBARA, S. e OSANO, H. Increased microvascular permeability and lesion formation during gastric hypermotility caused by indomethacin and 2-deoxy-D-glucose in the rat. **J. Clin. Gastroenterol.** v. 12, n. 1, p. S76-84, 1990.

TALLEY, N. J.; EVANS, J. M.; FLEMING, K. C.; HARMSSEN, W. S.; ZINSMEISTER, A. R. e MELTON, L. J. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and dyspepsia in the elderly. **Dig. Dis. Sci.** v. 40, p. 1345-1350, 1995.

TANG, R. S. e CHAN, F. K. Therapeutic management of recurrent peptic ulcer disease. **Drugs.** v. 72, n. 12, p. 1605-1616, 2012.

TANIZAWA, H.; TODA, S.; SAZUKA, Y.; TANIYAMA, T.; HAYASHI, T.; ARICHI, S. e TAKINO, Y. Natural antioxidants. In: Antioxidative components of tea leaf (*Thea sinensis* L.). **Chem. Pharm. Bull.** 32, p. 2011-2014, 1984.

TARNAWSKI, A. S. Cellular and Molecular Mechanisms of Gastrointestinal. Ulcer Healing. **Dig. Dis. Sci.** v. 50, Supl. 1, , p. S24-S33, 2005.

TARNAWSKI, A. S. e AHLUWALIA, A. Molecular mechanisms of epithelial regeneration and neovascularization during healing of gastric and esophageal ulcers. **Curr. Med. Chem.** v. 19, n. 1, p. 16-27, 2012.

TARNAWSKI A. S.; AHLUWALIA, A. e JONES M. K. Gastric cytoprotection beyond prostaglandins: cellular and molecular mechanisms of gastroprotective and ulcer healing

actions of antacids. **Curr. Pharmaceut.Design.** v. 19, n. 1, p. 126-132, 2013.

THAWONSUWAN, J.; KIRON, V.; SATOH, S.; PANIGRAHI, A. e VERLLAC, V. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) affects the antioxidant and immune defense of the rainbow trout. *Oncorhynchus mykiss*. **Fish Physiol. Biochem.** v. 36, n. 3, p. 687-97, 2010.

THE HELICOBACTER FOUNDATION. **Epidemiology.** Disponível em: <<http://www.helico.com/?q=Epidemiology.html>> Acesso em: 22 jun. 2014.

THORSEN, K.; SOREIDE, J. A.; KVALOY, J. T.; GLOMSAKER, T. e SOREIDE, K. Epidemiology of perforated peptic ulcer: age and gender adjusted analysis of incidence and mortality. **World J. Gastroenterol.** v. 19, n. 3, p. 347-354, 2013.

TUNARU, S.; ALTHOFF, T. F.; NÜSING, R. M.; DIENERC, M e OFFERMANN, S. Castor oil induces laxation and uterus contraction via ricinoleic acid activating prostaglandin EP3 receptors. **PNAS – Nat. Acad. Sci.** v. 109, n. 23, p. 9179-9184, 2012.

TWARDOWSCHY, A. Vias envolvidas no mecanismo de ação do efeito gastroprotetor das cascas de *Tabebuia avellanedae* Lorentz ex Griseb (Bignoniaceae). **Dissertação de mestrado.** UFP. Paraná. Curitiba. Brasil, 2007.

WALLACE, J. L. Mechanisms of Protection and Healing: Current Knowledge and Future Research. **Am. J. Med.** v. 110, n. 1A, p. 19S–23S, 2001.

WALLACE, J. L. Prostaglandins, NSAIDs, and Gastric Mucosal Protection: Why Doesn't the Stomach Digest Itself? **Physiol. Rev.** v. 88, n. 4, p. 1547-1565, 2008.

WALLACE, J. L. e DEVCHAND, P.R. Emerging role for cyclooxygenase-2 in gastrointestinal mucosal defense. **Brit. J. Pharmacol.** v. 145, n. 3, p. 275-282, 2005.

WALLACE, J. L. e SHARKEY, K. A. Farmacoterapia da acidez gástrica, úlceras pépticas e doença do refluxo gastroesofágico. In: GOODMAN, L. S.; GILMAN, A.; BRUNTON, L. L.; CHABNER, B.; KNOLLMANN, B. C. **Goodman e Gilman as bases farmacológicas da terapêutica.** Porto Alegre: AMGH, 2012, Cap. 45, p. 1309-1321.

WHO. World Health Organization. **WHO Guidelines on safety monitoring of herbal medicines in pharmacovigilance systems.** Geneva, 2004.

WOUTERS, A. M. A.; ISSMA, S.; FAN, S. W. e HAWORTH, N. L. Thiol-based redox signalling: rust never sleeps. **Internat. J. Biochem. Cell. Biol.** v. 43, p. 1079-1085, 2011.

YANG, C. S.; WANG, H.; LI, G. X.; YANG, Z.; GUAN, F. e JIN, H. Cancer prevention by tea: evidence from laboratory studies. **Pharm. Res.** v. 64, n. 2, p. 113-122, 2011.

YASUI, K. e BABA, A. Therapeutic potential of superoxide dismutase (SOD) for resolution of inflammation. **Inflam. Res.** v. 55, n. 9, p. 359-363, 2006.

YEOMANS, N. D. The ulcer sleuths: The search for the cause of peptic ulcers. **J. Gastroenterol. Hepatol.** v. 26, Suppl 1 (35-41), p. 35-41, 2011.

YOSHIKAWA, M.; MORIKAWA, T.; LI, N.; NAGATOMO, A.; LI, X. e MATSUDA, H. Bioactive Saponins and Glycosides. XXIII.1) Triterpene Saponins with gastroprotective effect from the seeds of *Camellia sinensis* - Theasaponins E3, E4, E5, E6, and E7. **Chem. Pharm. Bull.** v. 53, n. 12, p. 1559-1564, 2005.